



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

EFFECTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD AUXINICA AIA, AIB, ANA, 2,4-D Y DCP SOBRE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL DE FRIJOL MUNGO (Vigna radiata)

277239

T E S I S

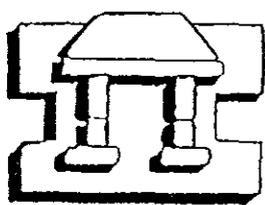
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

LUIS BARBO HERNANDEZ PORTILLA

ASESOR: DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO



IZTACALA LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2000



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

DEDICO ESTE TRABAJO A LAS PERSONAS QUE NUNCA HAN DEJADO DE APOYARME A MI PADRE JOSE, POR TODOS LOS CONSEJOS Y POR TODO SU APOYO; A MI MADRE, SILVIA, GRACIAS POR EXIGIRME MAS EN LA VIDA ACADEMICA A MIS HERMANOS, MARTHA, MARCO ANTONIO, ROSA JOEL, IRMA Y JESUS, Y A MI SOBRINO CESAR, YA QUE CON SU AYUDA LOGRE TERMINAR UNA META EN MI VIDA.

AGRADECIMIENTOS

Dr. IGNACIO PEÑALOSA, *gracias por recibirme y darme el apoyo que hasta ahora, ha significado mucho en mi.*

Al M. en C. CESAR FLORES, *por todas sus enseñanzas en el laboratorio, y por ser más que mi profesor , un amigo.*

A mis profesores Josefina V. Rafael Q. Elias, Manuel y Tzasna. *Por sus consejos y su apoyo brindado durante la carrera.*

A mis compañeros de generación y amigos: Aldo, Mario, Alberto, Francisco, Juan Manuel, Jose. Miguel, Jaime, Victor, Jeronimo, Antonio, Oscar, Jorge, Francisco Eduardo, Eduardo, Alfredo, Jesus, Alejandro, Gerardo, Daniel, Hugo, Dani, Manuel, Carlos, Alejandro, Angie, Alejandra, Raquel, Leonor, Nely, Xochilth, Edith, Adriana, Nancy, Paty, Sonia, Yolanda, Veronica, Viky

Y como es imposible hacer una lista demasiado grande, les pido su comprensión y una disculpa si en estos momentos no logro mencionar a todos.

INDICE

	Pag.
INDICE DE FIGURAS.....	I
ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	1
III INTRODUCCION.....	2
IV ANTECEDENTES.....	3
IV.I Marco conceptual de auxinas.....	3
IV.II Marco conceptual de mitocondrias.....	4
IV.III Relación entre mitocondrias y auxinas.....	9
V OBJETIVOS.....	13
VI MATERIALES Y METODOS.....	14
VI.I Germinación y obtención de plántulas.....	14
VI.II Obtención de fracción mitocondrial.....	14
VI.III Determinación de la respiración mitocondrial.....	15
VI.IV Obtención de espectro de absorción del citocromo <i>b</i>	15
VI.V Determinación de la respiración del citocromo <i>c</i>	16
VI.VI Determinación del potencial transmembranal con safranina.....	16
VII RESULTADOS.....	17
VIII DISCUSION.....	25
IX CONCLUSIONES.....	29
X REFERENCIAS.....	30

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.- Esquema general de la cadena respiratoria y el acoplamiento de la fosforilación oxidativa.	5
Figura 2.- Trazo típico para la determinación del efecto de los compuestos auxínicos sobre los parámetros respiratorios de Edo. 3, Edo. 4, ADP/O y CR.	7
Grafica 1.- Efecto de los compuestos sobre el estado 3 de la respiración, la aplicación de los compuestos está descrita en la parte metodológica.	17
Grafica 2.- Efecto de los compuestos sobre el estado 4 de la respiración	18
Grafica 3.- Efecto de los compuestos sobre el control respiratorio (C.R.)	19
Grafica 4.- Efecto de los compuestos sobre la relación ADP/O	20
Gráfica5.- Efecto de los compuestos auxínicos sobre los espectros de absorción del citocromo <i>b</i>	21
Gráfica 6.- Efecto de los compuestos sobre el Citocromo <i>b</i> . En esta gráfica se observan los valores de área calculados con el programa WinLab.	22
Gráfica 7.- Efecto de los compuestos sobre el citocromo <i>c</i> .	23
Gráfica 8.- Efecto de los compuestos sobre el potencial de membrana generado durante la respiración.	24

ABREVIATURAS

AIA	Acido indol-3-acético
AIB	Acido indol-3-butírico
AIP	Acido indol propiónico
ANA	Acido naftalenacético
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
DCP	2,4-diclorofenol
MCPP	2,-metil-4-clorofenoxipropiónico
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
Pi	Fosforo inorgánico
NADH	Nicotin adenin dinucleotido reducido
TMPD	N,N,N',N'.Tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamida
2,4-DB	Acido 2,4-dibenzoico
CCPU	Cloro-piridilfenilurea
G	Giberelinas
BSA	Albumina de suero bovino
CCCP	Carbonilcianida <i>m</i> -clorofenilhidrazona

RESUMEN

Las auxinas son hormonas vegetales empleadas en el enraizamiento de diferentes especies vegetales. Se han realizado diferentes trabajos empleando a las auxinas como agentes enraizadores, sin embargo, no se han realizado trabajos que involucren al metabolismo mitocondrial, como parte del mecanismo de acción de las auxinas. Por lo que en el presente trabajo se pretende caracterizar el efecto de 5 compuestos con actividad auxínica (AIA, ANA, AIB, 2,4-D y DCP) sobre la respiración mitocondrial en hipocotilos de frijol mungo *Vigna radiata* como parte de su mecanismo de acción. Para llevar a cabo este objetivo se determinaron los parámetros cinéticos de la respiración, con electrodo de Clark, la absorción del citocromo *b* por espectros diferenciales, la respiración del citocromo *c* con el donador de electrones TMPD específico para este citocromo y la determinación del potencial de membrana con safranina. Los resultados muestran que los parámetros cinéticos de la respiración se modifican en forma poco significativa en presencia de los compuestos con actividad auxínica. Por otro lado las actividades parciales del citocromo *b* y citocromo *c* muestran efectos importantes a concentraciones muy elevadas; siendo el potencial de membrana interna mitocondrial el parámetro que se afecta de manera más importante, ya que 2,4-D, AIA, ANA y AIB tienen efectos menos intensos pero significativos, mientras que el DCP abate los niveles del potencial generado hasta un 95 %. De lo anterior podemos concluir que el mayor efecto lo observamos sobre el potencial de membrana interna mitocondrial, y que las auxinas AIA, ANA y 2,4-D no muestran efectos significativos sobre la actividad del citocromo *b* y citocromo *c*. Por último el compuesto con mayor actividad desacoplante es el DCP.

III. INTRODUCCIÓN

El ácido indolacético (AIA) fue la primera hormona vegetal usada en el enraizamiento por Cooper, en mil novecientos treinta y cinco. En el mismo año Zimmerman y Wilcoxon descubrieron que varias auxinas sintéticas entre ellas el ácido indolbutírico AIB, también promovían el enraizamiento. Se han realizado varios trabajos a partir de este descubrimiento, encontrándose en la mayoría de los casos, un incremento en el número de raíces formadas al tratar estacas de plantas con auxinas (Alvarez *et al*, 1989; Bachelard y Stowe, 1963; Batten y Goodwin, 1978; Blakesley *et al*, 1991; Bose *et al*, 1972; Eliasson y Arebald, 1984; Gorter, 1969; Haissig *et al*, 1992; Hartman y Kester, 1983; James, 1983a; Jarvis y Booth, 1981; Jarvis y Shaheed, 1986; Nordström *et al*, 1991). Se han estudiado muchas sustancias que se comportan como auxinas como los ácidos, indolpropiónico (AIP), naftalenacético (ANA), benzofurano acético, diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2 metil-4 clorofenoxipropiónico (MCP). El menos estable es el AIA (Bachelard y Stowe, 1963), el más efectivo para estimular el alargamiento, al menos en cereales, es el MCP (Sánchez de Jiménez *et al*, 1981) y los que promueven con mayor eficiencia la formación de raíces adventicias son el AIB y el ANA (Alvarez *et al*, 1989). Hasta ahora no se ha planteado una explicación con soporte experimental suficiente para conocer cómo las auxinas estimulan la formación de raíces adventicias. Entre otras alternativas para aproximarse a este conocimiento, se han analizado las diferencias en la capacidad promotora en diferentes auxinas, la actividad de sistemas que influyen sobre la concentración de auxinas en diferentes tejidos (síntesis, degradación, conjugación, transporte), sin embargo, a pesar de que se ha demostrado en la respuesta de alargamiento la participación de ATPasas de protones que consumen ATP y en vista de que puede suponerse una relación entre los procesos que conducen a la formación de intermediarios de alta energía y los que demandan a estos intermediarios, como la multiplicación, arreglo y crecimiento de tejidos, en esta tesis se estudió la posible relación de ambos fenómenos a través de los efectos de cuatro auxinas y un compuesto fenólico sobre la respiración en mitocondrias aisladas.

IV. ANTECEDENTES

IV.1 Marco conceptual de auxinas

Se ha propuesto que la mayor estimulación que promueven el AIB y el ANA puede deberse a la carencia de una maquinaria enzimática para su degradación, sin embargo, Riov y Epstein (1988) mostraron en *Phaseolus mungo** que las velocidades de degradación del AIA y el AIB son semejantes, aunque se encuentran diferencias en los productos que resultan de ésta. Peñalosa (1998) reporta que existe una auxina oxidasa en el apoplasto de hipocótilos de frijol mungo con una K_m menor para el AIA con respecto a la de AIB.

En cuanto a la biosíntesis y distribución de las auxinas, se sabe que estas se producen en los ápices y son transportadas polarmente, en dirección basipétala (Eliasson, 1972) con gasto de energía, la mayor parte de ellas se mueve longitudinalmente, y sólo muy pequeñas cantidades son translocadas lateralmente. el aumento en la velocidad de transporte correlaciona con la promoción del crecimiento. En contraste, las auxinas aplicadas exógenamente se mueven principalmente en dirección acropétala, sin que para este movimiento exista gasto de energía, llevándose a cabo como resultado del movimiento del agua por la transpiración (Hoard *et al*, 1971).

Las auxinas entran a las células porque son ácidos débiles lipofílicos permeables a la membrana (Sitbon y Perrot-Rechemann, 1997). El transporte transmembranal del AIA es además catalizado por acarreadores específicos de incorporación y de eflujo para aniones del AIA (que es la forma más abundante en el citosol) (Goldsmith, 1977; Delbarre *et al*, 1996). La proteína involucrada en el control del eflujo de auxinas es el receptor para el ácido naftilftalámico, que es una proteína integral (Bernasconi *et al*, 1996) y que se ha relacionado con el transporte polar de las auxinas a nivel de toda la planta, mientras que la función del acarreador de influjo es aún desconocida (Delbarre *et al*, 1996).

*Existe sinonimia de esta especie con *Vigna radiata* y *Phaseolus aureus*

La polaridad característica del transporte de auxinas resulta de diferencias en la actividad translocadora de AIAH y de AIA⁻ por parte de las regiones de membrana plasmática de cada extremo de las células que transportan esta auxina (Wilkinson y Morris, 1994). Estas diferencias se atribuyen a la asimetría en la distribución de acarreadores que provocan el eflujo de auxina (Allan y Rubery, 1991).

Las auxinas como el AIA no se encuentran solamente en forma libre en las plantas, sino también en forma de diferentes complejos que por cierto son extremadamente lábiles. La mayor parte del AIA producido en las plantas se encuentra conjugado en dos formas generales: conjugados con azúcares mediante enlaces éster y conjugados con aminoácidos o péptidos mediante enlaces amida, siendo estos últimos los más abundantes en las dicotiledóneas (Campanella *et al*, 1996). Entre los conjugados pueden mencionarse: AIA unido a proteínas, AIA-glucosa, AIA-aspártico e indolacetamida, además, se reportan conjugados de AIB, AIP y 2,4-D con el ácido aspártico (Thimann, 1965).

IV.II Marco conceptual de mitocondrias.

El número de mitocondrias por célula es relativamente constante y característico para cada tipo determinado de célula. Las células vegetales pueden llegar a tener cientos de ellas (Salisbury 1991). Las mitocondrias se hallan frecuentemente localizadas en las proximidades de las estructuras que precisan ATP, producto principal de su actividad bioquímica, o cerca de una fuente de combustible, de la cual dependen. La membrana interna de las mitocondrias hepáticas contienen al menos 60 proteínas diferentes con actividad biológica, incluidas en un sistema de bicapa fosfolípida. Entre ellas se encuentran las enzimas y proteínas del transporte electrónico, las enzimas implicadas en la síntesis de ATP, diversas deshidrogenasas, así como los componentes proteicos del sistema de transporte de diversos metabolitos (Moore y Siedow, 1991).

La figura 1 muestra un esquema del transporte electrónico de la cadena respiratoria el cual esta acoplado a la producción de energía que da por resultado la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, a expensas del gradiente electroquímico generado por el transporte electrónico hasta el oxígeno. El transporte electrónico desde el NADH hasta el oxígeno es la fuente directa de la energía utilizada para la fosforilación acoplada del ADP. Existen tres zonas en la cadena en las que se producen descensos relativamente grandes de energía libre, cada una de los cuales es lo suficientemente grande como para aportar la energía necesaria para la síntesis de ATP (Morre, *et al*,1978).

Para evidenciar la generación de un potencial que aporte la energía necesaria para la síntesis de ATP se utilizan colorantes como la safranina (Moore y Bonner, 1982).

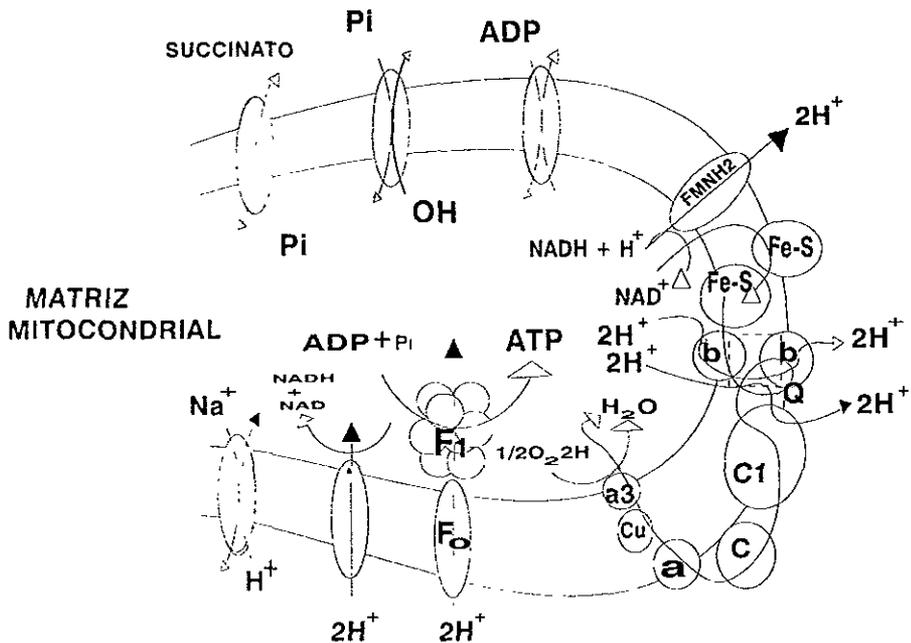


FIGURA 1.- Esquema general de la cadena respiratoria y el acoplamiento de la fosforilación oxidativa.

La reacción global para la fosforilación de la cadena respiratoria indica que el fosfato y el ADP son necesarios para el proceso de transporte electrónico desde el NADH hasta el oxígeno. Cuando sólo falta ADP en el medio, la velocidad de respiración disminuye y no se produce fosforilación debido a la inexistencia del aceptor del fosfato, esta situación se conoce como Estado 4 de la respiración. Al añadir una cantidad conocida de ADP a este sistema, el consumo de oxígeno experimenta un incremento hasta un valor máximo; correlativamente, se observa que el ADP añadido se fosforila y rinde ATP, este estado recibe el nombre de respiración activa, o Estado 3. Cuando todo el ADP es fosforilado la velocidad de consumo del oxígeno desciende, y vuelve a la velocidad del Estado 4 (Douce, *et al*, 1987). Figura 2.

El Control Respiratorio es la relación entre la velocidad de respiración de la mitocondria en presencia de abundante ADP y la velocidad de respiración en ausencia de ADP. Esta relación puede ser elevada cuando las mitocondrias están intactas obteniendo valores mayores de 3. Cuando están lesionadas o envejecidas pierden su capacidad de fosforilar el ADP y la relación puede ser igual a 1 (Douce, 1987) Figura 2. La relación que existe entre ADP/O es la medida del ADP fosforilado con respecto a la cantidad de oxígeno consumido, durante la fosforilación.

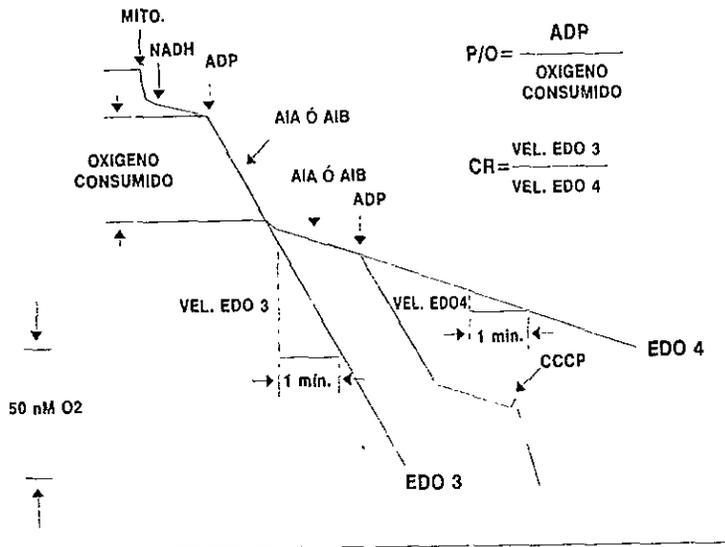


Figura 2.- Trazo típico para la determinación del efecto de los compuestos auxínicos sobre los parámetros respiratorios de Edo. 3, Edo. 4, ADP/O y CR.

Los inhibidores juegan un papel importante en la formulación de las teorías de la fosforilación oxidativa, la elucidación de los transportadores electrónicos y la vía de generación de ATP. Los inhibidores se clasifican de la siguiente manera (Moreland, 1980).

a) Inhibidores del transporte de electrones. Se caracterizan por su habilidad para interrumpir el flujo de electrones en algún punto de la cadena respiratoria, actuando en uno de los complejos (Rotenona, Amital, Antimicina, Azida entre otros).

b) Agentes desacoplantes. Son bases o ácidos débiles lipofílicos, evitan la fosforilación del ADP sin interferir con el transporte electrónico promoviendo la disipación del gradiente de energía generada por el transporte electrónico, (Dinitrofenoles, 2-azido-4-nitrofenol y 2-nitro-4-azido carbonilcianuro).

c) Inhibidores de transferencia de energía. Los compuestos de este grupo inhiben el estado 3 de la respiración. Se considera que se combinan con un intermediario que acopla la energía generada en la cadena con la síntesis de ATP. La oligomicina inhibe la síntesis de ATP por la unión en la subunidad F_0 , de modo que interfiere con el transporte de H^+ a través de F_0 .

d) Inhibidores desacoplantes. Estos actúan en varios sitios de la cadena respiratoria interfiriendo con la generación de ATP por la estimulación de la respiración en el estado 4 con malato, succinato y NADH como sustratos (Tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD); 1,2,3-tiadiazolyl-fenilureas y algunos de los Ácidos fenoxiacano carboxílicos (incluyendo al 2,4-DB)) (Moreland, 1980).

A concentraciones apropiadas, los desacoplantes clásicos, impiden la fosforilación del ADP sin interferir con el transporte electrónico. En general algún compuesto que promueve la disipación de la energía generada por el transporte electrónico, puede ser llamado desacoplante, este tipo de compuestos incrementan el consumo de oxígeno en mitocondrias altamente acopladas por la eliminación de la influencia reguladora normalmente ejercida por P_i y ADP. (Moreland, 1980).

Muchos factores pueden influenciar la respuesta de las mitocondrias vegetales. La fuente de la que se aíslan las mitocondrias (especie, tejido y edad); la composición de la mezcla de reacción, el sustrato oxidable, el solvente del inhibidor, la concentración final del solvente en la mezcla de reacción, y el tiempo que transcurre desde que se obtiene la muestra hasta que se utiliza (Moreland, 1980).

Existe información limitada sobre el efecto de los herbicidas y de compuestos con actividad auxínica en sistemas metabólicos a nivel celular y molecular; en reacciones asociadas a cloroplastos, en respuestas mediadas por mitocondrias y con respecto a sus interacciones con la membrana.

IV.III Relación entre mitocondrias y auxinas

En la actualidad la relación entre las auxinas y las mitocondrias ha sido poco estudiada, encontrando como antecedentes algunos trabajos realizados con compuestos auxínicos y herbicidas enlistados a continuación: el trabajo realizado por Mannella, (1978), en el cual observan una inhibición de la NADH deshidrogenasa de la membrana externa mitocondrial de *Solanum tuberosum* por el 2,4-Diclorofenoxiacético el cual tiene su efecto a niveles inferiores de 0.2 mM de NADH, mientras que al incrementar los niveles la actividad se recupera. Además el 2,4,5-Triclorofenoxiacético también presenta un efecto inhibitorio en papa (*Solanum tuberosum*) y frijol mungo (*Phaseolus aureus*) y por otro lado cuando se aplica AIA no se observa el efecto de inhibición (Mannella, 1978).

Roussaux, (1985), observó el efecto de varios compuestos derivados de adenina y algunas auxinas, como el ácido triyodobenzoico (TIBA), 2,4-D y la cloro piridilfenilurea (CPPU), en la oxidación de succinato y malato en mitocondrias aisladas de tubérculos de papa fresca (*Solanum tuberosum*), encontrando que los derivados de adenina tienen un efecto inhibitorio a concentraciones de 5 a 10 veces menores que las auxinas en la oxidación de succinato, y sin cambios en la fosforilación, mientras que, con TIBA y 2,4-D disminuye la relación ADP/O. Ningún derivado de adenina muestra cambios en la oxidación de malato, en cambio las fitohormonas muestran potente actividad inhibitoria, principalmente TIBA y CPPU.

Pireaux, (1990), observó el efecto que tienen dos compuestos herbicidas llamados inhibidores desacoplantes de la vía del transporte de electrones, sales de amonio (AACL 6) y un herbicida 2,4-D sobre mitocondrias de papa (*Solanum tuberosum*) vieja y fresca. Ya que las mitocondrias pueden ser un posible blanco de estos compuestos. Se observó el efecto de estos compuestos sobre el citocromo y la vía alterna, encontrando que está última mostró más resistencia a AACL 6 que la vía del citocromo. En contraste el 2,4-D rápidamente puede inhibir la vía alterna.

Demos, *et al* (1975); examinó el efecto de 10 compuestos fenólicos sobre el crecimiento de hipocotilos y metabolismo mitocondrial de frijol mungo (*Phaseolus aureus*). Los ácidos tánico, *p*-cumárico y gentísico tienen un efecto inhibitor del crecimiento de hipocotilos, inhiben la respiración y disminuyen el control respiratorio, además de impedir la absorción de Ca^{2+} y el transporte de fosfato PO_3^- . El ácido vanílico también inhibe el crecimiento de los hipocotilos y reduce la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, pero no afecta la respiración ni el control respiratorio. Este es el primer compuesto reportado que inhibe la entrada de calcio a la mitocondria. Dos compuestos fenólicos (particularmente el ácido protocatéquico) no muestran un efecto significativo en el crecimiento de los hipocotilos y no afectan la fosforilación oxidativa. Existen 3 compuestos (ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido *p*-hidroxibenzoico) que promueven una reducción muy significativa en el crecimiento de los hipocotilos y algunos de ellos no inhiben los procesos que se llevan a cabo en las mitocondrias. En conclusión, los compuestos fenólicos que alteran la respiración en las plantas o en mitocondrias aisladas también inhiben el crecimiento de los hipocotilos.

Morré, *et al*, (1995); observó la actividad de NADH oxidasa de vesículas aisladas de membrana plasmática de frijol de soya (*Glycine max*) y el crecimiento por alargamiento en segmentos de hipocotilos de 1 cm de largo, encontrando que estas variables fueron estimuladas por las auxinas AIA y 2,4-D. La estimulación inducida de la actividad de la NADH oxidasa y el crecimiento, fueron inhibidas por los reactivos de thiol N-etilmaleimida (NEM), *p*-cloromercuribenzoato (PCMB), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrofenilbenzoico) (DTNB), ditiotreitól y glutatión reducido, todos ellos agentes que bloquean grupos SH; además de que el NEM, PCMB y el DTNB no tienen efecto inhibitor sobre la NADH oxidasa. Con respecto al crecimiento, el 2,4-D lo induce y en pretratamientos con NEM, PCMB y DTNB es estimulado ligeramente. En presencia de ditiotreitól o glutatión reducido, ambos ácidos, el AIA y 2,4-D pueden estimular e inhibir la actividad de NADH oxidasa según la concentración de cada una.

Los resultados demuestran una diferencia fundamental entre el estímulo de la actividad de la NADH oxidasa por las auxinas y la actividad constitutiva de la NADH oxidasa, que sugiere la participación del sitio activo del tiol en el estímulo de la auxina pero no en la actividad constitutiva.

Wilson, *et al*, (1991), realizó bioensayos con diferentes sustancias variando la concentración de catecol, fenol, ácido indol 3 butírico(AIB), mezcla de giberelinas (G), HCl, NaOH, polietilenglicol (PEG) y NaCl observando que a medida que aumenta su concentración inhiben la rizogénesis y tienen un efecto letal. Sin embargo, provocan una promoción de la rizogénesis del 90 al 95 % a concentraciones bajas.

Existen compuestos que actúan en combinación con las auxinas potenciando la respuesta, de ahí el término que se les da de sinérgicos. En estudios realizados con frijol mungo, se ha encontrado que el requerimiento estructural para que un compuesto fenólico estimule el enraizamiento, es que posea una sustitución orto- de grupos hidroxil y una posición para- libre-. Riov (1989), observó que el ácido 3,5-dihalo-4-hidroxibenzoico y el ácido 2,4-dinitrofenol incrementan de manera importante la formación de raíces adventicias en frijol mungo. Estos compuestos comparten con las auxinas la promoción de raíces adventicias, pero además actúan como desacoplantes de la respiración mitocondrial. El ácido 4-hidroxibenzoico estimula el enraizamiento a concentraciones elevadas, el 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoico tiene una actividad intermedia, mientras que el 3,5-diyodo-4-hidroxibenzoico tiene una mayor actividad, estos dos compuestos estimulan el enraizamiento con y sin auxina. El ácido salicílico tiene un efecto menor en la estimulación.

En el trabajo realizado por Sánchez, (1996), se observa un efecto de inhibición de la velocidad del estado 3 al aplicar *in vitro* AIA y AIB. El AIB ocasiona una mayor disminución en la velocidad del estado 3 a una concentración de 100 μ M. Al explorarse el efecto de las auxinas en la velocidad del estado 4 se observa un incremento en el consumo de oxígeno. Reportando a estas auxinas como inhibidores de la respiración en el estado 3 y desacoplantes de la respiración en el estado 4.

De acuerdo a los antecedentes mencionados y ante la falta de estudios que proporcionen evidencia de la relación entre el metabolismo mitocondrial y la acción de las auxinas en la estimulación de la formación de raíces, en el presente estudio se pretende caracterizar el efecto de AIA, AIB, ANA, 2,4-D y el 2,4-Diclorofenol (DCP) sobre los componentes de la cadena respiratoria en mitocondrias aisladas de frijol mungo (*Vigna radiata*).

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de AIA, AIB, ANA, 2,4-D y DCP sobre la respiración mitocondrial de frijol mungo (*Vigna radiata*) *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Determinar el efecto de AIA, AIB, ANA, 2,4-D y DCP sobre la respiración en estado 3, la respiración en estado 4 y la fosforilación oxidativa.

-Determinar el efecto sobre el Citocromo *b* mediante el análisis de espectros diferenciales.

-Determinar el efecto sobre el Citocromo *c* mediante el donador de electrones TMPD.

-Determinar con safranina el potencial transmembranal en mitocondrias para observar el efecto desacoplante y la generación de la energía necesaria para la síntesis de ATP

VI. MATERIALES Y METODOS

VI.I GERMINACIÓN Y OBTENCIÓN DE PLANTULAS

Se desinfectaron semillas de frijol mungo (*Vigna radiata*) con hipoclorito de sodio al 4% durante 30 minutos. Se lavaron varias veces con agua destilada y se mantuvieron en agua corriente durante 24 h. Se germinaron en una palangana de 50 x 40 cm, con 5 cm de espesor de agrolita saturada con agua destilada durante 72 h. a 30 °C en oscuridad.

VI.II OBTENCIÓN DE FRACCIÓN MITOCONDRIAL

Se aislaron las mitocondrias por el método de Bonner, (1967) con algunas modificaciones. Se retiraron las plántulas de la agrolita, obteniéndose los hipocotilos y desechando la raíz cortando a 1 cm por debajo del nodo cotiledonar. Se homogeneizaron 100 g de hipocotilos durante 8 seg en una licuadora con 130 ml de medio de homogeneizado (el cual consistió de: Manitol 0.3 M; EDTA 2 mM; Cisteína 4 mM; BSA 0.1 % y PVP insoluble 0.1 % a pH 7.4). El homogeneizado se filtró a través de 5 capas de gasa ajustando el pH a 7.4 con TRISMA, el filtrado se centrifugó en centrifuga refrigerada a 4°C, a 1,500 x g. durante 10 min, posteriormente se desechó la pastilla y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 12,100 x g. durante 10 min, seguido de esto se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 2 ml de medio de lavado (el cual consistió de: Manitol 0.3 M; EDTA 1 mM; BSA 0.1 % a pH 7.4) se llevó a un volumen final de 25 ml para centrifugarlo a 9,800 x g durante 10 min, finalmente todas las pastillas se resuspendieron en un volumen total de 1.5 ml de medio de lavado constituyendo ésta la fracción mitocondrial. La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de suero de bovino (BSA) como estándar.

VI.III DETERMINACION DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.

El consumo de oxígeno se siguió polarográficamente con un electrodo Clark, a 30° C con agitación en la celda de 200 rpm. Los estudios de respiración se realizaron empleando 0.9 ml de medio de reacción conteniendo: Manitol 0.3 M, KH_2PO_4 10 mM, MgCl_2 5 mM y KCl 10 mM, pH 7.2 TRISMA (Bonner, 1967). Al medio de reacción se le adicionaron de 400 a 600 $\mu\text{g/ml}$ de proteína mitocondrial, 400 μM de NADH, y 100 μM de ADP.

El efecto de las auxinas sobre el transporte de electrones mitocondrial, fue analizado en los estados respiratorios 3 y 4, titulando con AIA, AIB, ANA, 2,4-D y DCP en un intervalo de concentración de 100 a 500 μM .

VI.IV OBTENCIÓN DE ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL CITOCROMO *b*

La obtención del espectro del Citocromo *b* se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Douce *et al*, (1978) con algunas modificaciones las cuales se describen a continuación. Se trazó una línea basal del citocromo en estado oxidado posteriormente se adicionaron 400 μM de NADH para reducir al citocromo y obtener el espectro reducido en medio con: 1 ml de glicerol, 1.5 ml de medio de reacción para mitocondrias anteriormente descrito, 0.7 ml de fracción mitocondrial (de 280 a 420 $\mu\text{g/ml}$) 30 μl de antimicina A a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ de etanol para quedar a una concentración final de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Para observar si los compuestos tuvieron un efecto sobre el citocromo *b* estos se aplicaron a una concentración final de 166.6 μM . El citocromo *b* fue sometido a un barrido de 400 a 600 nm en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer modelo Lambda 2.

VI.V DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE RESPIRACIÓN DEL CITOCROMO *c*

Para la obtención de la velocidad respiratoria del Citocromo *c*, se siguió polarográficamente en electrodo de Clark. El medio de reacción para llevar a cabo la reacción fue el mismo que se empleó para determinar los parámetros cinéticos de la respiración, sólo que en este caso no se adicionó el NADH como sustrato ni ADP como agente aceptor del fosfato sino que solamente se agregaron al medio de reacción, las mitocondrias y TMPD como el donador de electrones para el Citocromo *c* a una concentración de 10 μM .

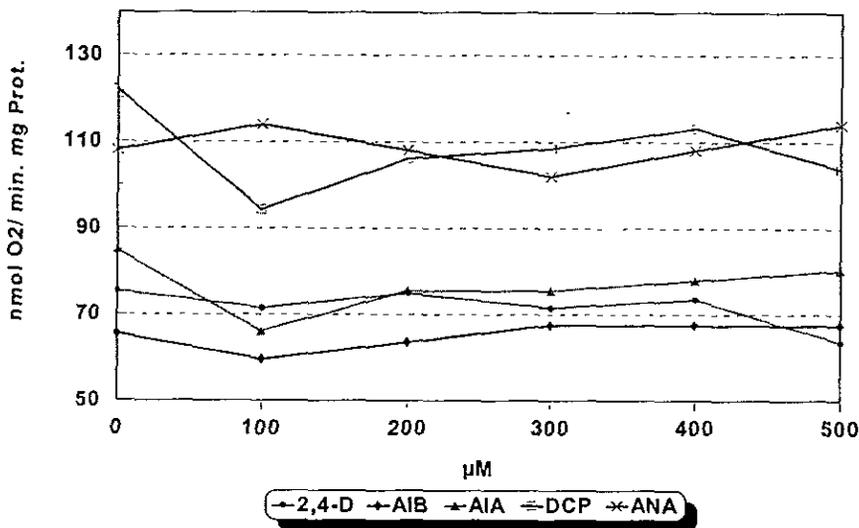
VI.VI DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL CON SAFRANINA.

Se colocaron en una cubeta 2.5 ml de medio de reacción para mitocondrias anteriormente descrito y se adicionó rotenona 1 μM y safranina 16 μM . El trazo se inició con la adición de las mitocondrias quedando a una concentración final aproximada de 400 a 600 μg de Prot. ml^{-1} , se esperaron 5 minutos para que las mitocondrias consumieran los sustratos endógenos, y se adicionaron 400 μM de NADH, se esperó a que se formara el potencial, posteriormente se adicionaron 300 μM de ADP para promover la utilización del potencial por la ATP sintetasa; una vez que el potencial se recuperó, se adicionó CCCP a una concentración final 1 μM para colapsar el potencial y obtener la absorbancia mínima. Los compuestos auxínicos se adicionaron después de la formación del potencial por la adición de ADP. Los cambios en el potencial transmembranal se reportaron como un potencial generado en mV ($\Delta\psi$) (Moore, y Bonner, 1982). Lo anterior se realizó con un espectrofotómetro de doble rayo AMINCO DW 2000 con una primera longitud de onda de 511 nm y una segunda de 533 nm.

VII RESULTADOS

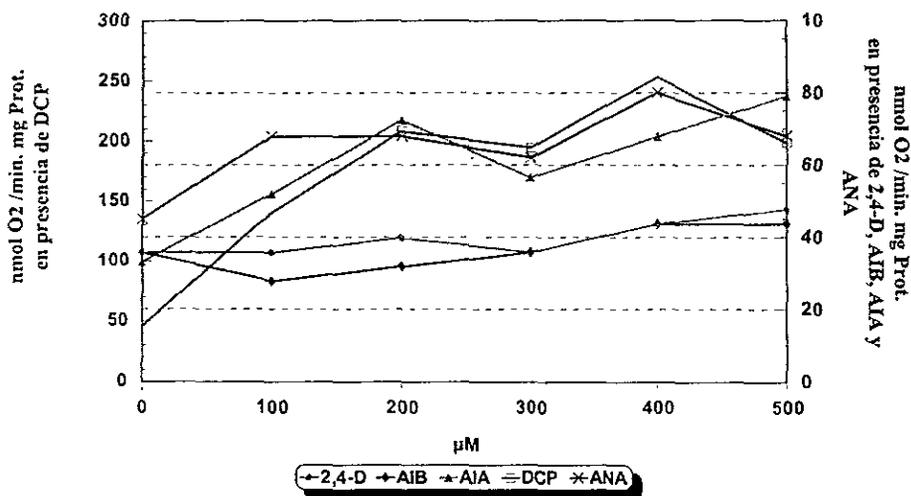
En el presente trabajo se evaluaron los parámetros cinéticos de la respiración en mitocondrias intactas; y la actividad parcial del citocromo *b* y citocromo *c*. Los resultados que a continuación se describen, fueron seleccionados como experimentos tipo representativo de un mínimo de 2 ensayos y en los casos donde se indique se muestran como el promedio de las repeticiones realizadas. La descripción y discusión de estos resultados hace énfasis en el efecto comparativo entre las auxinas evaluadas.

En la gráfica 1 podemos observar que el efecto producido sobre la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 por los cinco agentes evaluados muestran un comportamiento constante, donde la tasa de respiración no registra variaciones significativas en el intervalo de concentraciones de 0 a 500 μM . En particular el 2,4-D no modifica significativamente la tasa de respiración en Edo. 3 hasta 400 μM , por encima de esta concentración se registra una disminución de 13 % sobre la velocidad. Por su parte el AIA, AIB y ANA no ejercen modificación alguna sobre el Edo. 3 aun a concentraciones de 500 μM . Finalmente, el DCP tiene un efecto inhibitorio sobre la velocidad del Edo. 3, disminuyendo de 122 a 94 nmoles $\text{O}_2/\text{min. mg Prot.}$ a 100 μM que representa un descenso de 22.95 %.



Gráfica 1.- Efecto de los compuestos sobre el estado 3 de la respiración, la aplicación de los compuestos está descrita en la parte metodológica.

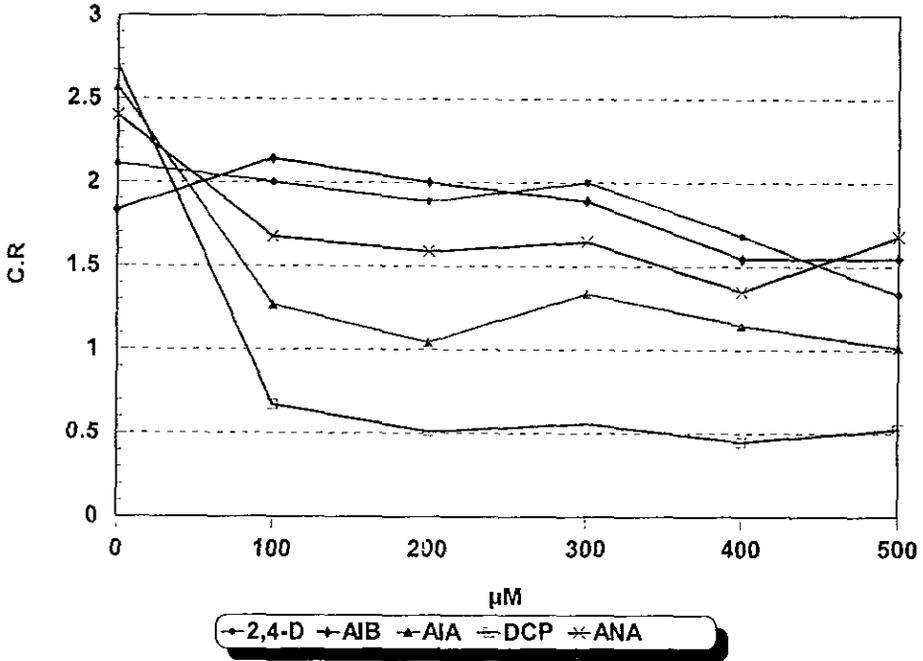
En relación al efecto de las auxinas sobre el Edo. 4 se puede observar (gráfica 2) que existe una tendencia general de incrementar la tasa de consumo de oxígeno pasiva. El compuesto que presenta el mayor efecto es el DCP, ya que como se muestra en la gráfica se incrementa la velocidad en un 338.4 % de 0 a 500 μM ; por su parte el AIA estimula de 33 a 79 nmoles de $\text{O}_2/\text{min. mg Prot.}$ (139.4 %) a 500 μM . Finalmente el AIB, 2,4-D y ANA registran un incremento en la respiración de 35.71 a 43.65; de 35.71 a 47.62 y de 45 a 68 nmoles de $\text{O}_2/\text{min mg Prot.}$ lo que representa un 22.2, 33.35 y 51 % para cada compuesto respectivamente.



Grafica 2.- Efecto de los compuestos sobre el estado 4 de la respiración. Los resultados mostrados proceden de un experimento, sin que existan diferencias significativas con respecto a lo obtenido en cualquiera de los 2 ensayos realizados. Las escalas a izquierda y derecha buscan facilitar la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos.

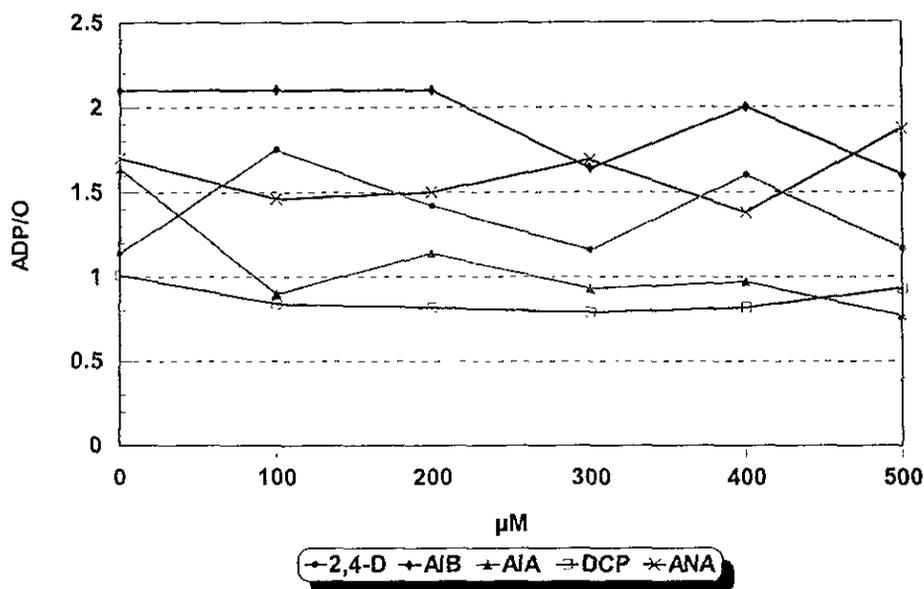
En relación a la evaluación del efecto de las auxinas sobre el control respiratorio, a continuación se presentan los resultados obtenidos. En primer lugar se debe mencionar que los registros iniciales de control respiratorio caen en un rango que es satisfactorio tomando en cuenta la integridad mitocondrial que se espera en extractos de plantas (C.R.= 2 a 2.5).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con la ligera disminución de la velocidad del Edo. 3 y el marcado incremento de la tasa de consumo de oxígeno en el Edo 4 el control respiratorio se abate significativamente para la cinco auxinas evaluadas. En la gráfica 3 se puede observar que el valor más bajo del control respiratorio se registra con el tratamiento de DCP, el cual disminuye el C.R. de 2.6 a 0.52 (80 %) a una concentración de 200 μM ; por su parte el 2,4-D disminuye el C. R. de 2.1 a 1.33 (36.6 %) a una concentración de 500 μM , el AIB también reduce el C. R. de 1.8 a 1.5 (16.6 %), el ANA de 2.4 a 1.67 (30.4 %) y el AIA de 2.5 a 1.01 (59.6 %).



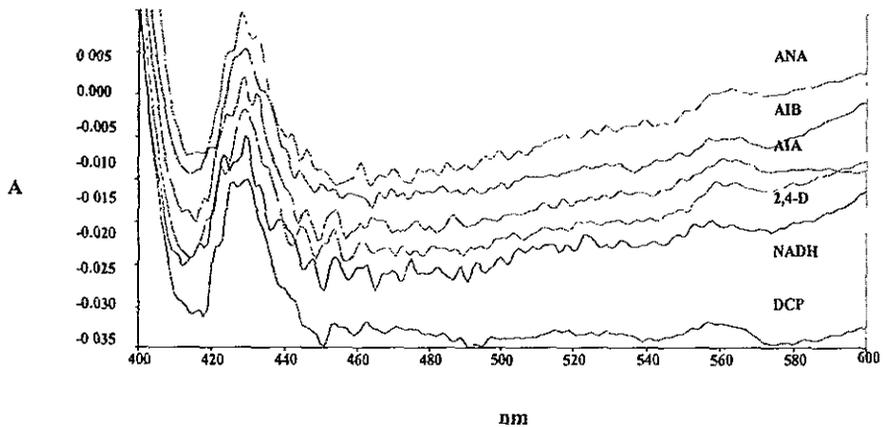
Gráfica 3.- Efecto de los compuestos sobre el control respiratorio (C.R.)

En relación al efecto de las auxinas sobre la relación ADP/O (gráfica 4) se observa una tendencia general a mantener constante sus valores en presencia de los 5 tratamientos y en el rango de concentraciones evaluadas de 0 a 500 μM . Como se puede observar en la gráfica 4 los valores de la relación ADP/O oscilan entre 1.5 y 2 moléculas de ATP producidas por cada átomo de oxígeno reducido. Dado que los experimentos son independientes, no se parte de un valor inicial único de relación ADP/O para todos los casos, por lo cual las variaciones entre experimentos o entre tratamientos, están dadas por el diferente origen de la muestra, sin embargo, en los diversos experimentos se aprecian las mismas tendencias, al variar la concentración de cada agente.



Gráfica 4.- Efecto de los compuestos sobre la relación ADP/O

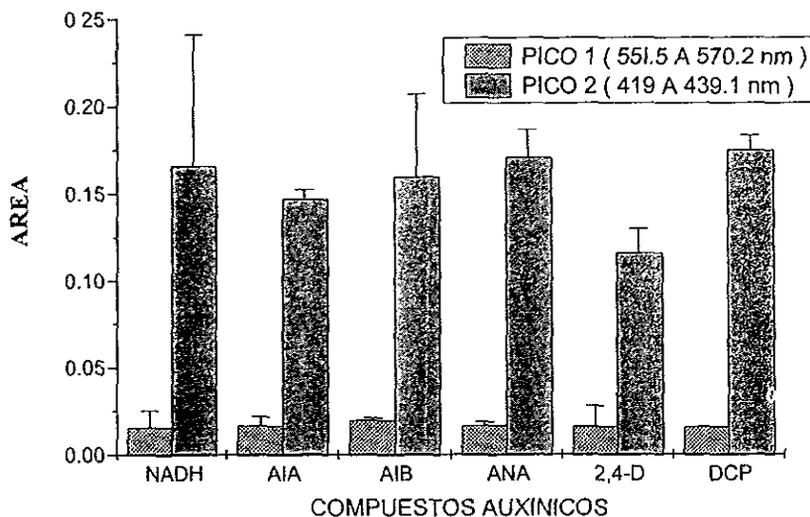
En los resultados referentes al posible efecto sobre el citocromo *b*, por los compuestos con actividad auxínica, como se ilustra en la gráfica 5. Se obtiene que no existe disminución de ninguno de los picos del citocromo *b* al aplicar estos compuestos, esto sugiere que ninguna de las auxinas ejerce su efecto sobre esta enzima. Al comparar cada espectro diferencial en presencia de las auxinas y el DCP no se registran diferencias realmente significativas en la presencia o intensidad de los picos, lo cual sugiere que no intervienen en la reducción del citocromo *b*. Al observar la gráfica con los espectros notamos que existen diferencias en la absorbencia de cada espectro, esto probablemente se debe a la concentración de proteína mitocondrial, ya que todos los experimentos son independientes. La concentración de hormona que se utilizó para cada uno de los espectros fue de 500 μM



Gráfica5.- Efecto de los compuestos auxínicos sobre los espectros de absorción del citocromo *b*

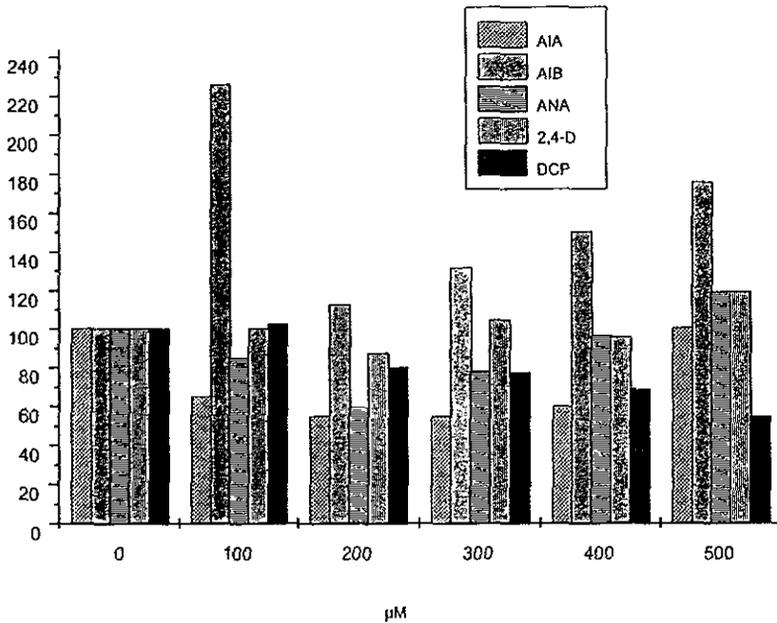
El estado de oxidorreducción del citocromo *b* puede registrarse a través del patrón de absorbencia en ciertas regiones del espectro. En particular, en los intervalos de 551.5 a 570 y de 419 a 439.1 en la gráfica 6 tenemos los valores calculados de área bajo los picos en el rango de 551.5 a 570.2 nm para el pico 1 y de 419 a 439.1 nm para el pico 2 del citocromo *b*, a los diferentes tratamientos probados. Estos valores de área fueron calculados con el programa de PE (Lambda 2).

Para el caso del pico 1 no se observan diferencias significativas, lo que sugiere que los compuestos probados no tienen efecto sobre este pico. Para el caso del pico 2 se observa que sí existen diferencias entre el AIA y el control (NADH), y entre el 2,4-D y el control. Sin embargo, las variaciones que existen dentro del control hacen que se aprecie que las variaciones debidas a los tratamientos no son significativas y de acuerdo a los espectros obtenidos se observa más claramente que no hay diferencias. Cabe mencionar que los resultados de esta gráfica resultan del promedio de 2 ensayos para cada compuesto y para el control.



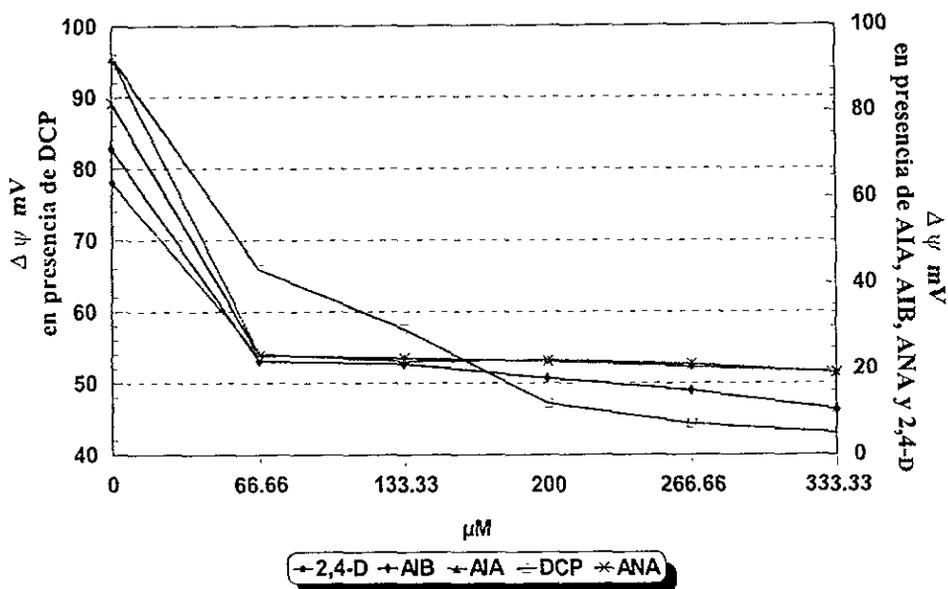
Gráfica 6.- Efecto de los compuestos sobre el Citocromo *b*. En esta gráfica se observan los valores de área calculados con el programa WinLab.

En relación al efecto de las auxinas sobre la actividad del citocromo *c*, los resultados obtenidos como se muestran en la gráfica 7 indican que las interacciones más importantes se dan con el DCP, el cual disminuye en un 50 % la actividad del citocromo y por otro lado con el AIB el cual estimula la actividad del citocromo en un 80 % a 500 μM . Por su parte el AIA y el 2,4-D disminuyen en 10 % la actividad del citocromo mientras que el ANA la estimula en 10 %.



Gráfica 7.- Efecto de los compuestos sobre el citocromo *c*.

De todos los parámetros cinéticos y de actividad parcial de las enzimas evaluadas, el que mayor efecto registra es el potencial de membrana. Como se puede observar en la gráfica 8 los compuestos AIA, ANA y 2,4-D disminuyen el potencial de membrana de 95.46 a 51.47 el $\Delta \psi$ mV (46.04 %); de 89.16 a 51.47 el $\Delta \psi$ mV (46.77 %) y de 78.02 a 51.47 el $\Delta \psi$ mV (31.45 %) respectivamente a una concentración de 66.6 μ M. Por otro lado el AIB lo disminuye de 82.78 a 53.06 el $\Delta \psi$ mV (35.91 %) a una concentración de 66.6 μ M y a una concentración de 333.3 μ M lo disminuye de 82.78 a 46.32 el $\Delta \psi$ mV (44.1 %). El DCP es el compuesto que tiene la mayor capacidad desacoplante como lo muestra el gráfico, ya que a una concentración de 66.6 μ M lo disminuye un de 92.72 a 43.15 el $\Delta \psi$ mV (53.5 %) y a una concentración final de 333.3 μ M el potencial generado prácticamente tiende a cero con un valor final de 5.07.



Gráfica 8.- Efecto de los compuestos sobre el potencial de membrana generado durante la respiración.

VIII DISCUSION

Para explicar el mecanismo de acción mediante el cual las auxinas llevan a cabo su efecto de inducción rizogénica, se han propuesto diferentes teorías que describen su participación a nivel de la regulación de la expresión génica, regulando al metabolismo y modificando el transporte a través de membranas. No obstante la dependencia de energía en forma de ATP para cualquiera de los procesos mencionados arriba, no existen suficientes evidencias que permitan involucrar al metabolismo mitocondrial como un punto primario de interacción de auxinas para llevar a cabo su efecto (Peñalosa, 1999; Peñalosa *et al*, 1996). Por lo cual en el presente trabajo se evaluó el efecto de las auxinas AIA, AIB, ANA, 2,4-D y DCP sobre la respiración mitocondrial. Para evaluar dicho efecto se registraron los parámetros cinéticos de Edo. 3, Edo 4 C. R. y ADP/O; así como las actividades individuales del citocromo *b* y citocromo *c*, adicionalmente se determinó la formación y disipación del potencial de membrana en las mitocondrias intactas.

En reportes previos se indica una ligera interacción de auxinas como 2,4-D AIA y AIB con el metabolismo mitocondrial, sin embargo, una descripción amplia considerando mayor cantidad de compuestos con actividad auxínica y una evaluación más específica de los efectos era necesaria.

En general se puede resumir de los resultados obtenidos que los parámetros cinéticos de la respiración se modificaron en forma poco significativa en presencia de las auxinas, así mismo las actividades parciales del citocromo *b* y citocromo *c* sólo mostraron efectos importantes a concentraciones elevadas. Por otro lado se observa que el parámetro que se afectó de manera más importante es el potencial de la membrana interna mitocondrial, donde los resultados indican que el DCP abate hasta niveles de cero el potencial generado, mientras que las auxinas AIA, AIB, ANA y 2,4-D tienen efectos menos intensos pero muy significativos.

En particular el Edo 3 de la respiración, como se puede observar en la gráfica 1 no registró cambios significativos en presencia de las auxinas, solamente una disminución menor se registró con 2,4-D a concentraciones de 500 μM , esta disminución no puede considerarse como un efecto específico de la hormona ya que la concentración empleada está por arriba de los niveles necesarios para que ejerza su efecto en plantas íntegras; un efecto similar de inhibición ya había sido reportado para el 2,4-D en mitocondrias de papa (Pireaux, 1990).

En cuanto al efecto de las auxinas sobre la respiración en Edo 4, como se puede observar en la gráfica 2, el incremento en la respiración que muestran todos los tratamientos podría ser explicado por una interacción específica de las hormonas sobre el sistema multienzimático de las mitocondrias, ya que en las condiciones de reposo del Edo 4 no hay presencia de ADP lo cual permitiría acoplar el transporte de electrones asociado al consumo de oxígeno con la síntesis de ATP. En otras palabras el Edo 4 de la respiración nos indica un transporte electrónico pasivo el cual puede ser debido a poca integridad en la membrana o disipación inespecífica del gradiente. Por lo cual ninguna de las auxinas ni el DCP tuvo efectos significativos sobre la actividad del citocromo *b* o en el citocromo *c*.

Por otro lado la disminución encontrada del control respiratorio en presencia de las auxinas y el DCP como se puede observar en la gráfica 3 puede ser explicado por la acción conjunta de estas sustancias sobre los estados 3 y 4 disminuyendo la actividad del primero y aumentando la del segundo. Cabe enfatizar que este es el comportamiento característico de un inhibidor-desacoplante. Este comportamiento inhibidor-desacoplante ya había sido previamente documentado para auxinas y herbicidas (Moreland, 1980).

En cuanto a la relación ADP/O, ésta no sufrió variaciones significativas ya que su cálculo se ubica en la fase activa de la respiración, es decir, en el estado 3 y como ya se había discutido arriba las auxinas no presentan efectos significativos sobre este estado.

Por otro lado al evaluar las actividades del citocromo *b* y *c* aplicando AIA, 2,4-D y ANA no mostraron cambios significativos, aun a concentraciones de 500 μM , que son consideradas muy por arriba de los niveles fisiológicos. No obstante lo anterior, el efecto posible de estas sustancias, es mucho menor que el encontrado para el cianuro que a concentraciones tan bajas como 0.5 μM es capaz de inhibir al citocromo *c* en 100 %, mientras que, las concentraciones necesarias para que estos compuestos variaran la actividad del citocromo fue de 500 μM .

Dado que el volumen de mitocondrias obtenidas a partir de un volumen de 150 ml de tejido correspondía a 1.5 ml y ya que el ensayo supone diluir 1:10 las mitocondrias, se tiene una modificación de la concentración de mitocondrias en un factor de 10. De esta forma considerando que no se vea afectada la relación [hormona]/[mitocondrias], se esperaría que una concentración de auxinas 500 μM 10 veces mayor que la que tiene efectos fisiológicos) fuera capaz de afectar la población de moléculas de citocromo que

también resultaría en las condiciones de ensayo 10 veces más concentración que en una situación fisiológica. En este orden de ideas no puede despreciarse el efecto estimulante del AIB a 500 μM sobre la actividad del citocromo *c* ni el efecto del DCP inhibitorio a concentraciones de 500 μM sobre la actividad del citocromo *c* más aún si de forma sistemática, se logró una mayor disminución en su actividad mientras se incrementó la concentración de 0 a 500 μM .

El AIB mostró un comportamiento bimodal sobre la actividad del citocromo *c* sugiriendo la existencia de 2 sitios posibles de interacción, lograndose mayores efectos estimulantes de actividad en el sitio con mayor afinidad, en vista de que la concentración 100 μM fue la más efectiva, y a 500 μM logró la mayor estimulación despues de ella.

El efecto más importante en el presente trabajo fue el potencial de membrana interna mitocondrial; como se puede observar en la gráfica 8 con una concentración de 66 μM las 4 auxinas evaluadas y el DCP disminuyeron en más del 50 % el potencial generado y en particular el DCP abatió totalmente el gradiente. Este comportamiento desacoplante concuerda con los resultados obtenidos en cuanto al incremento de la actividad respiratoria en Edo 4 y pueden ser explicados en términos de la naturaleza ácida que tienen todos los compuestos evaluados. La forma de acción de estos compuestos puede ser resultado de un proceso dinámico de equilibrio ácido-básico entre la región más concentrada de protones y la menos concentrada. En otras palabras los compuestos podrían atrapar un protón en el espacio intermembranal disminuyendo así su polaridad y pasar a la matriz mitocondrial donde las condiciones notablemente más alcalinas inducirían su disociación formando la base conjugada correspondiente. El ciclo descrito arriba puede repetirse de forma continua hasta disipar totalmente el gradiente. El presente trabajo refuerza lo reportado por Roussaux, (1985) en mitocondrias de papa en vista de que se encuentran efectos similares sobre la perturbación del potencial de membrana con 2,4-D.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente las auxinas mostraron su efecto sobre la respiración mitocondrial de una forma inespecífica, ya que el estado respiratorio más activo (Edo 3) y las actividades de las enzimas no se afectaron significativamente, a diferencia de lo anterior las etapas más pasivas (Edo 4) se afectaron significativamente y son dependientes de la concentración.

Finalmente la participación de los fenoles en el mecanismo de acción de las auxinas ha sido discutido *previamente* en función de su interacción con la ruta de degradación del ácido indol-3-acético, donde intervienen actuando como antioxidantes a través de la remoción del peróxido de hidrógeno necesario para la inactivación del AIA; así como su asociación con la inhibición del crecimiento de hipocotilos en plantas intactas (Demos, 1975). En el presente trabajo se documenta una función adicional de los fenoles dentro del mecanismo de acción de las auxinas donde estos actúan como inhibidores-desacoplantes interfiriendo la síntesis de ATP. Las implicaciones que podría tener este efecto de abatimiento de los niveles de ATP, hasta el momento no pueden ser explicados con certeza, sin embargo, existen propuestas incipientes que indican algún tipo de vínculo con la actividad y función de ATPasas en diferentes compartimentos celulares que a su vez mantienen niveles iónicos y de polaridad necesarios para la acción auxínica; asimismo el abatimiento de los niveles de ATP puede interferir con la tasa óptima de conjugación de AIA dependiente de ATP; sin embargo, el esclarecimiento de estos vínculos demanda experimentos que se encuentran fuera de los alcances del presente trabajo de tesis.

La dimensión en que resultan afectados fenómenos como la formación de raíces adventicias al aplicar sustancias como las que se examinaron en este trabajo (particularmente AIB y ANA) no corresponden con el más débil efecto sobre parámetros respiratorios como el que se constató sobre el potencial de membrana interna mitocondrial; lo anterior sugiere que la posible relación de la respiración mitocondrial con el proceso de activación que las auxinas promueven en la formación de raíces adventicias, no representa un rol central en el proceso; en todo caso, puede corresponder a un papel complementario a una vía principal que sea promovida por estas auxinas, como podría ser el que se disminuyeran los potenciales transmembranales para modular el transporte selectivo de ciertos iones.

CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados del presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

El principal efecto de las auxinas evaluadas sobre la respiración mitocondrial es la disipación del potencial de la membrana interna mitocondrial.

Las auxinas AIA, ANA y 2,4-D no muestran efectos significativos sobre la actividad del citocromo b y c, mientras que el AIB facilita la oxidación del citocromo c con TMPD y el DCP la dificulta.

El compuesto con mayor actividad desacoplante es el 2,4-Diclorofenol (DCP).

ESTE LIBRO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

X REFERENCIAS

Allan, A C. and Rubery, P. H. 1991. Calcium deficiency and auxin transport in *Cucurbita pepo* L. seedlings. *Planta*. 183:604-612.

Alvarez, R. Nissen, S. J. and Sutter, E. G. 1989. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indole-3-3-butiric acid. *Plant Physiol*. 89:439-4443.

Bachelard, E.P. and Stowe, B.B. 1963. Rooting of cuttings of *Acer rebrum* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 751-767.

Batten, d. J. and Goodwin, P.B. 1978. Phytohormones and the induction of adventitious roots. In: *Phytohormones and related compounds. A comprehensive treatise*, Vol 2 (Ed. by D. S. Letham, P. B. Goodwin and T. J. V. Higgins), pp137-173. Elsevier/North Holland.

Blaskesley, D. Weston, G. D. and Hall, J. F. 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. Part I: Evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Regulation*. 10:341-353.

Bonner, W. 1967. A general method for the preparation of plant mitochondria. *Methods in enzymology*. IX:126-130.

Bose, T. K. Roy, B. N. and basau, R. N. 1972. Synergism between auxins and phenolic compounds in the rooting of cuttings. *Indian Agr.* 16:171-176.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein. *Anal. Biochem.* 72: 248-258.

Campanella, J. J. Ludwig-Muller, J. and Town, C. D. 1996. Isolation and characterization of mutants of *Arabidopsis thaliana* with increased resistance to growth inhibition by indoleacetic acid-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 112:735-745.

Cooper, W. C. 1935. Hormones in relation to root formation on stem cuttings. *Plant Physiol.* 10:789-794.

Delbarre, A. Muller, P. Imhoff, V. and Guern, J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic in suspension-cultured tobacco cells. *Planta.* 198:532-541.

Demos, E. K. Woolwine, M. Wilson, R. H. and McMillan, C. 1975. The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. *Amer. J. Bot.* 62 (1): 97-102.

Douce, R. Neuburger, M. Bligny, R. and Pauly, G. 1978. Effects of β -pinene on the oxidative properties of purified intact plant mitochondria. En *Plant Mitochondria*, Duocet, G. and Lance, C. eds. Elsevier/North-Hollan Biomedical Press. pp 207-214.

Eliasson, L. 1972. translocation of shoot applied indolylacetic acid into the roots of *Populus tremula*. *Physiol. Plant.* 27:412-416.

Eliasson, L. and Arebald, K. 1984. Auxin effects on rotting in pea cuttings. *Plant Physiol.* 61:293-297.

Epstien, E. and Ludwig-Müller, J. 1993. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiol. Plant.* 88:382-389.

Goldsmith, M. H. M. 1977. The polar transport of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:439-478.

Gorter, C. J. 1969. Auxin Synergists in the rooting of cuttings. *Physiol. Plant.* 22: 497-502.

Haissig, B. E. davies, T.D. and Reimenschneider, D. E. 1992. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiol. Plant.* 84: 310-317.

Hartmann, H.T. and Kester, D.E. 1983. Plant propagation, principles and practices. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall inc. 298-342. ISBN-0-13-681007-1.

Hoard, G. V. Hillman, S. K. and Wareing, P. F. 1971. Studies on the movement of indole auxins in wilow. *Planta.* 99:73.

James, D. J. 1983. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. factors affecting the lenght of the auxin-sensitive phse in M.9. *Physiol. Plant.* 57:149-153.

Jarvis, B. C. and Booth, A. 1981. Influence of indolebutiric acid, boron, myo-inositol, vitamin D and seedling age on adventitious root development in cuttings of *Phaseolus aureus*. *Physiol. Plant.* 53:213-218.

Jarvis, B.C. and Shaheed, A. I. 1986. Adventitious root formation in relaticn to the uptake and distribution of supplied auxin. *New Phytol.* 103: 23-31.

Lehninger, A. L. 1978. Bioqímica. Ediciones Omega, S. A. Barcelona España. pp 1117.

Mannella, C. A. and Bonner, W. D. 1978. 2,4-Diclorophenoxyiacetic acid inhibits the outer membrane NADH-Dehydrogenase of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 62:468-469.

Moore, A. L. and Bonner, D. Jr. 1982. Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranine method. *Plant Physiology* 70:1271-1276.

Moreland, D. E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:597-638.

Morré, D. J. Brightman, O. Hidalgo, A. and Navas, P. 1995. Selective inhibition of auxin-stimulated NADH oxidase activity and elongation growth of soybean hypocotyls by thiol reagents. *Plant Physiol.* 107: 1285-1291.

Nordström, A-C. Alvarado Jacobs, F. and Eliasson, L. 1991. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiol.* 96:856-861.

Peñalosa C. I. 1998. Efecto del AIB, el AIA y el floroglucinol sobre la respiración en mitocondrias aisladas y la actividad auxinica oxidadas. Y su correlación con la respuesta de formación de raíces adventicias en hipocotilos de *Phaseolus aureus* bajo diferentes condiciones. Tesis Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM.

Peñalosa. C. I., Sánchez, G. S. y Flores, O. C. M. 1996. ¿ Interviene la respiración mitocondrial en el mecanismo de formación de raíces adventicias promovida por auxinas. *Ciencia Ergo Sum.* Vol. 3 No. 3 : 319-323.

Pireaux, J-C. and Dizengremel, P. 1990. Effects of a quaternary ammonium salt and 2,4-D on potato tuber mitochondria. *J. Plant Physiol.* 136: 349-355.

Riov, J. and Epstein, E. 1988. Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. *Physiol. Plant.* 74:556-560.

Riov, J. and Yang, S. F. 1989. Enhancement of adventitious root formation in mung bean cuttings by 3,5-dihalo-4-hydroxybenzoic acids and 2,4-dinitrophenol. *Plant Growth Regulation.* 8: 277-281.

Roussaux, J. Dizengremel, P. and Chauveau, M. 1985. Inhibition of mitochondrial oxidations by adenine-derivatives and auxin related compounds. *J. Plant. Physiol.* 123: 55-67.

Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. 4ª ed. Ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México. pp 759.

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

Sitbon, F. and Perrot-Rechenmann, C. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant.* 100:443-455.

Thimann, K. V. 1965. Toward an endocrinology of higher plants In: Recent progress in hormone research. Acad. Press 21:579.

Wilson, P. J. and Standen J. V. 1991. Promotion and inhibition of adventitious rooting in the mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) bioassay. *Journal of Horticultural Science* 66 (2): 151-154.

Zimmerman, P. W. and Wilcoxon, F. 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 7:209-229.