

00562 ①  
4  
1.4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"ACCION DE AUXINAS SINTETICAS EN LA GERMINACION DE MAIZ  
CARACTERIZACION DE RECEPTORES AUXINICOS"

00562  
1983

TESIS

Que para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

México, D.F.

1983

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

# INDICE

	PAG.
I INTRODUCCION .....	1
Hipótesis .....	5
Objetivos .....	7
Diseño Experimental .....	7
II ANTECEDENTES .....	10
1.-FITORREGULADORES .....	10
2.-AUXINAS SINTETICAS .....	12
3.-METABOLISMO DE AUXINAS .....	14
3.1-Biosíntesis del AIA .....	14
3.2-Catabolismo de auxinas .....	14
3.2.1-Oxidación del AIA .....	14
3.2.2-Conjugación del AIA .....	17
3.2.3-Conjugación de auxinas sintéticas .....	19
4.-TRANSPORTE DE AUXINAS.....	19
5.-EFECTOS DE LAS AUXINAS .....	21
5.1-Las auxinas en la elongación celular .....	22
5.2-Efecto de las auxinas en el metabolismo de carbo-	
hidratos .....	28
5.3-Las auxinas y la diferenciación celular .....	30
5.4-Efectos de las auxinas en ácidos nucleicos .....	30
6.-MECANISMO DE ACCION DE AUXINAS .....	34
6.1-Sitios de unión membranales .....	37
6.2-Sitios de unión no membranales .....	44
III MATERIALES Y METODOS .....	47
Materiales .....	47
1.-Reactivos .....	47
2.-Equipo .....	49
3.-Soluciones .....	50
4.-Material biológico .....	50
Métodos .....	50
1.-Síntesis del ácido 2-bromopropiónico .....	50

2.-Síntesis del ácido 2(2-metil-4-clorofenoxi)propiónico..	51
3.-Síntesis del ligando 2,4-diclorofenoxiacetamido- $\epsilon$ -L-lisina .....	51
4.-Síntesis de la columna de cromatografía de afinidad ...	53
5.-Determinación del rendimiento del acoplamiento de ligando a la Sefarosa .....	55
6.-Determinación de la curva de decaimiento del ligando acoplado a la Sefarosa .....	55
7.-Determinación de la especificidad de la columna de cromatografía de afinidad .....	55
8.- Determinación de proteínas .....	57
9.- Determinación de la $K_D$ del complejo receptor soluble-2,4-D <sup>14</sup> C .....	60
10.-Determinación del tiempo de vida media del complejo receptor soluble-2,4-D <sup>14</sup> C.....	62
11.-Cuantificación de la radiactividad .....	64
12.- Proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad .....	64
13.- Efecto del MCPP en las proteínas sintetizadas en las primeras horas de imbibición .....	65
14.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con DSS en una dimensión con gradiente de 7-15 % de acrilamida.....	67
15.-Electroforesis en geles en dos dimensiones .....	69
16.-Detección de proteínas <sup>14</sup> C en geles de poliacrilamida por fluorografía .....	72
IV RESULTADOS .....	73
V DISCUSION .....	102
VI BIBLIOGRAFIA .....	110

## FIGURAS

	PAG.
Figura 1 Estructura química de algunas auxinas sintéticas y de la auxina natural .....	4
Figura 2 Modelo de acción auxínica .....	6
Figura 3 Esquema de una semilla de maíz .....	8
Figura 4 Estructura química de algunos compuestos con actividad auxínica .....	13
Figura 5 Vías de biosíntesis de la auxina .....	15
Figura 6 Catabolismo oxidativo del AIA .....	16
Figura 7 Formas libre y unida de auxinas .....	18
Figura 8 Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de azul de Coomassie .....	58
Figura 9 Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Lowry .....	61
Figura 10 Síntesis del ligando 2,4-D-lisina .....	74
Figura 11 Activación y acoplamiento por el método de BrCl .....	76
Figura 12 Activación y acoplamiento por el método de NaIO <sub>4</sub> .....	79
Figura 13 Especificidad de la columna de afinidad .....	81
Figura 14 Gráfica de Scatchard .....	83
Figura 15 Determinación del tiempo de vida media .....	85
Figura 16 Patrón de elución de las proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad y eluidas con 2,4-D .....	87
Figura 17 Patrón de elución de las proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad y eluidas con HCPP .....	88
Figura 18 Patrón de elución de las proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad y eluidas con AHA .....	89

Figura 19 Patrón de elución de las proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad y eluidas con AIA .....	90
Figura 20 Perfil electroforético de los picos I y II de la columna de afinidad eluidos con 2,4-D .....	93
Figura 21 Perfil electroforético de los picos I y II de la columna de afinidad eluidos con MCPP .....	94
Figura 22 Fluorografía de las proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz sintetizadas en presencia de MCPP.....	97
Figura 23 Fluorografía de las proteínas posribosomales de ejes embrionarios de maíz (Control).....	98
Figura 24 Fluorografía de las proteínas del control que no se retuvieron en la columna de afinidad .....	100
Figura 25 Fluorografía del análisis electroforético en una dimensión de las proteínas retenidas en la columna de afinidad .....	101

### TABLAS

Tabla I Preparación de las columnas de cromatografía de afinidad	77
Tabla II Estabilidad de la columna de afinidad con 2,4-D-lisina como ligando .....	78
Tabla III Concentraciones de auxinas requeridas para eluir las proteínas del sobrenadante posribosomal de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad .....	91
Tabla IV Incorporación de aminoácidos $^{14}\text{C}$ en las proteínas sintetizadas durante las primeras horas de imbibición en ejes embrionarios de maíz.....	96

## I N T R O D U C C I O N

El estudio de la diferenciación celular constituye uno de los campos más atractivos de investigación desde el punto de vista bioquímico. Si bien el significado del término diferenciación celular es difícil de definir, aquí se usará la definición de Stoddart y Venis quienes consideran a la diferenciación celular como aquella serie de cambios moleculares que sufren las células de organismos eucariotes al pasar de un estado multipotencial a aquel punto en que asumen la estructura típica del tejido final (1).

Al abordar el estudio de este proceso nos enfrentamos con distintos problemas, así por ejemplo si estamos interesados en estudiar el proceso de diferenciación del tejido meristemático de una planta encontraremos que es muy difícil establecer cuáles células continúan dividiéndose y por tanto mantienen su naturaleza meristemática y aquellas que continúan creciendo y eventualmente se diferencian. En tanto que otro problema es el de que es casi imposible distinguir entre células que se están diferenciando para formar tejidos distintos (1).

Algunas de estas dificultades pueden ser superadas a través del uso de los cultivos de tejidos vegetales.

El cultivo de células vegetales consiste en una serie de técnicas mediante las cuales se logra mantener el crecimiento de dichas células en un medio sintético, estéril e *in vitro*. De esta manera a partir de células somáticas y mediante la manipu-

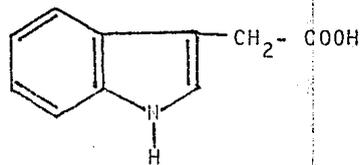
lación del medio nutritivo es posible la inducción de callos. Un callo es una agrupación de células similares, con un grado de organización menor al tejido que les dió origen (proceso de desdiferenciación) y totipotenciales, ya que a partir de estas células se pueden regenerar plantas (proceso de rediferenciación) (1,2). Ejemplos de cultivos en los que se ha logrado la rediferenciación son, entre otros, el de zanahoria, tabaco, tomate, etc. (3). Existen múltiples factores que influyen en la rediferenciación tales como: la composición del medio empleado, concentración de fitorreguladores, condiciones ambientales, la especie, el tejido empleado, su estadio fisiológico y la edad del callo (1,2,3).

El medio nutritivo en el cual se desarrollan los callos es ta constituido por compuestos que sirven como fuente de C y N al tejido, vitaminas, sales minerales y fitorreguladores como son las auxinas y las citocininas. En la actualidad se ha lle gado a la conclusión de que la relación auxina/citocinina es de gran importancia para inducir y mantener el estado desdiferen ciado de las células en cultivo, ya que estos fitorreguladores participan en los procesos de división y diferenciación celular. Debido a lo anterior la elección del tipo y concentración de fi torregulador empleado se convierte en un paso determinante en el establecimiento del cultivo (1,3).

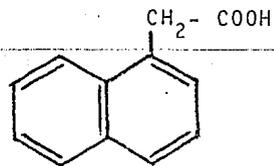
La técnica de cultivo de tejidos vegetales ha sido ampli mente desarrollada y se han hecho infinidad de publicaciones en plantas dicotiledóneas; sin embargo, los estudios en monocotile dó neas, especialmente en cereales son escasos (3).

En 1969 Yamada concluyó, al probar una serie de medios sintéticos para el crecimiento de células de cereales, que niveles altos de auxinas favorecen el cultivo de células monocotiledóneas. Entre las auxinas más efectivas para estos cultivos se encontraron a los compuestos sintéticos: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA), ya que para obtener el mismo efecto se requirieron concentraciones menores que de la auxina natural ácido indolacético (AIA), lo que haría suponer que la mayor parte del AIA incorporado a la célula se metaboliza rápidamente. Al parecer son las auxinas y no las citoquininas las que son absolutamente esenciales para la inducción de callos de arroz, trigo y maíz (3,4).

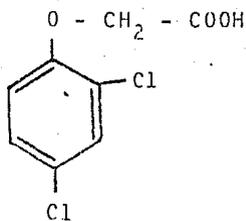
En trabajos efectuados anteriormente en nuestro laboratorio se ha tratado de optimizar el medio de cultivo para maíz, un cereal de gran importancia en la alimentación de nuestro país. Con este objetivo y sabiendo que el 2,4-D es una de las auxinas más eficientes en los sistemas de cultivo de tejidos, se decidió probar una serie de análogos del 2,4-D, es decir fenoxiácidos tales como el ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico (MCPP) y el ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico (DCPP) (Fig.1). Los resultados indican que ambos análogos son más eficientes que el 2,4-D en la inducción y mantenimiento de callos de maíz y que no se requiere citoquininas. Asimismo, se encontró que el embrión de maíz es la fuente más adecuada para la inducción de callos con un rendimiento de 21 % (4,5).



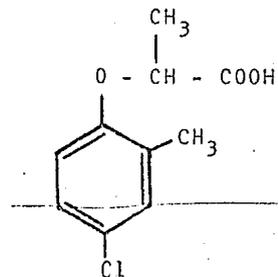
ACIDO INDOL-3-ACETICO  
(AIA)



ACIDO NAFTALENACETICO  
(ANA)



ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO  
(2,4-D)



ACIDO 2-METIL-4-CLOROFENOXIPROPIONICO  
(MCPP)

FIGURA 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNAS AUXINAS SINTETICAS Y DE LA AUXINA NATURAL (AIA).

La inducción y mantenimiento de callos de embrión de maíz por derivados de ácido fenoxiacético puede interpretarse de la siguiente manera: las auxinas son capaces de modificar la expresión genética del tejido y consecuentemente su estadio final de diferenciación.

La teoría de diferenciación celular más aceptada sostiene que los distintos tipos celulares difieren entre sí básicamente en las proteínas que contienen y por tanto que la diferenciación se efectúa a través de los mecanismos que controlan la producción de los distintos tipos de proteínas que contiene una célula durante toda su vida (3).

#### Hipótesis de trabajo.

Las auxinas intervienen en el proceso de diferenciación celular de las plantas, controlando la síntesis de proteínas a nivel transcripcional y/o post-transcripcional. Se propone que para llevar a cabo su acción, las auxinas interaccionan con una molécula receptora-móvil que al ser activada puede transportarse al núcleo desencadenando los efectos bioquímicos que lleven a la respuesta fisiológica observada. (Fig. 2).

Si el modelo anterior es cierto se esperaría encontrar un receptor auxínico libre en el citosol de las células blanco, que les permita ser sensibles al fitorregulador en la respuesta observada. Por otra parte sería de esperarse como resultado final de la acción auxínica una alteración en el patrón de proteínas sintetizadas en presencia de este fitorregulador en dichas células blanco.

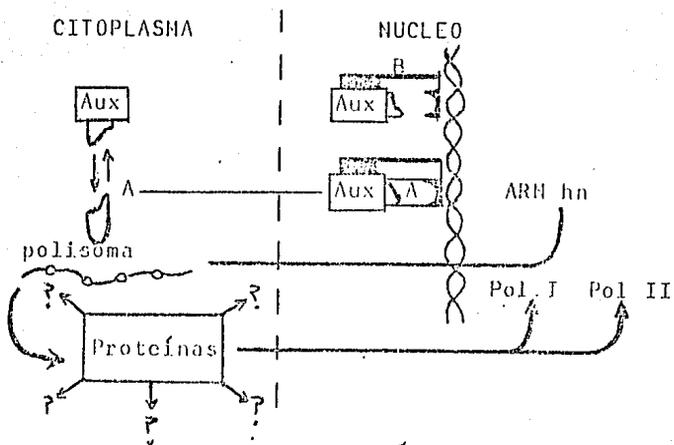


FIGURA 2 MODELO DE ACCION AUXINICA  
(MODELO DE LIBBENGA (72) MODIFICADO).

A pesar de que el modelo propuesto sugiere un gran número de aproximaciones experimentales, para comprobar su validez, en el presente trabajo se abordarán únicamente los siguientes objetivos:

Objetivos:

1) Localizar e identificar el receptor auxínico en el sobrenadante postribosomal de ejes embrionarios de maíz.

2) Analizar el efecto del MCPP, una auxina sintética, en la síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación, sabiendo que en presencia de estos fitorreguladores se altera el proceso de diferenciación normal (germinación), para dar lugar a la formación de callos.

Diseño Experimental.

El material biológico que se empleará serán semillas de maíz H-30 cosechas 1979 y 1980 de Chapingo, México.

Para abordar los objetivos propuestos se trabajará con ejes embrionarios y embriones de las semillas de maíz debido a que son los órganos a partir de los cuales se obtienen callos con mayor rendimiento (4). Asimismo se empleará la auxina sintética MCPP por ser muy eficiente en la inducción y mantenimiento de callos de maíz (4,5) (Fig. 3).

Se medirá la velocidad de síntesis de proteínas en ejes embrionarios de maíz, utilizando aminoácidos <sup>14</sup>C. La proteínas sintetizadas en ausencia y presencia de MCPP se identificarán mediante electroforésis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida y por autoradiografía.

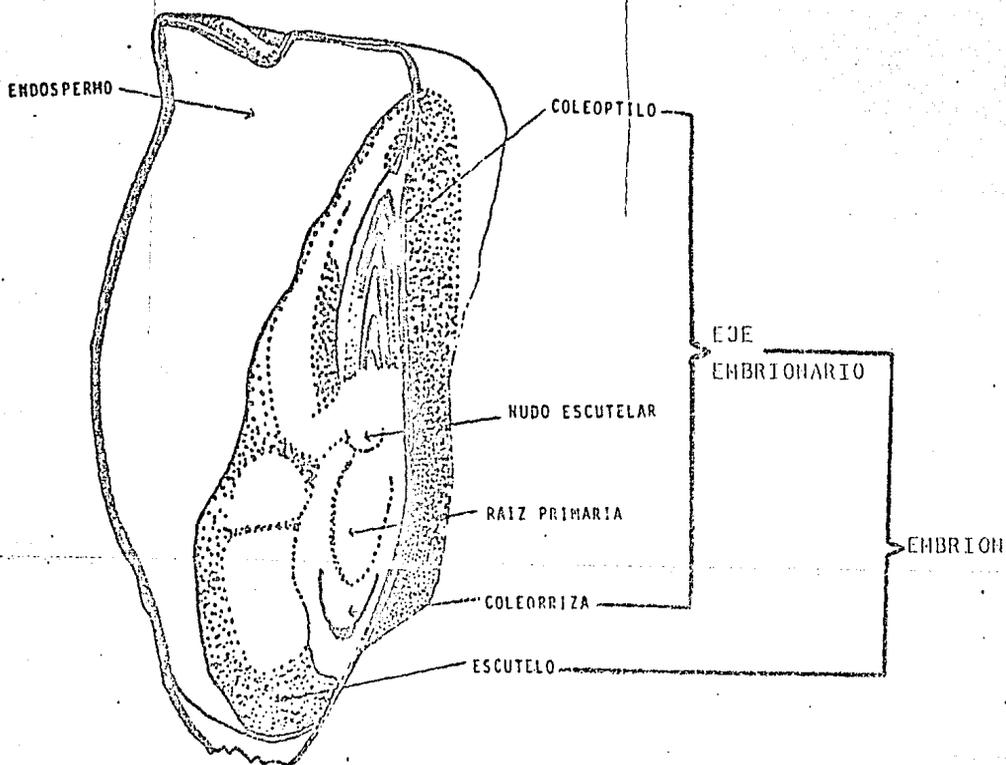


FIGURA 3 ESQUEMA DE UNA SEMILLA DE HAIZ

En la búsqueda del receptor de las auxinas se usará un sistema de afinidad selectivo sintetizado para este propósito. Las proteínas del sobrenadante postribosomal se pasarán a través de la columna de afinidad que contendrá 2,4-D-lisina como ligando.

## A N T E C E D E N T E S

1.- FITORREGULADORES.

El desarrollo de una planta es un proceso controlado estrictamente. Una planta posee una unidad estructural y funcional congruente con sus características básicas, derivadas en gran parte de su incapacidad de movimiento. Este hecho ha condicionado que las plantas hayan desarrollado mecanismos muy eficientes de adaptación al medio ambiente.

En la regulación del proceso de desarrollo vegetal intervienen una serie de compuestos químicos a los que se ha denominado: hormonas vegetales, reguladores del crecimiento vegetal o fito - rreguladores.

Estos compuestos pueden definirse como aquellas sustancias orgánicas, distintas a los nutrientes, que son activas en concentraciones mínimas (del orden de  $10^{-6}$ M o menos), que se sintetizan en una parte de la planta y que generalmente se translocan a otro sitio en donde producen las respuestas bioquímicas que llevan a cabo el efecto observado (6).

Sin embargo se ha observado que existen diferencias básicas entre estos compuestos y las hormonas animales ya que estas últimas tienen efectos específicos y actúan en órganos blanco particulares. Tal especificidad no es tan estricta en los tejidos vegetales y muchas de las respuestas de las plantas a estos compuestos se ha descubierto que están bajo el control de uno o más

En base a lo anterior en el presente trabajo se utilizará preferentemente el término fitorregulador o regulador del crecimiento vegetal para designar a estos compuestos.

Los reguladores del crecimiento vegetal se han agrupado en cinco clases de acuerdo a su naturaleza química y a sus efectos fisiológicos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico.

A continuación se describirán brevemente algunas de las funciones más características de estos compuestos. Las estructuras químicas de algunos fitorreguladores se esquematizan en la Fig. 4

**Auxinas.**- Promueven la elongación celular, inhiben la formación de yemas laterales (dominancia apical) y el crecimiento de la raíz. Intervienen en la diferenciación de células traqueidales y en la formación de callos. Estimulan la división celular. Intervienen entre otros en el metabolismo de carbohidratos, ácidos nucleicos y síntesis de proteínas.

**Giberelinas.**- Estimulan en general la germinación y el crecimiento del tallo, yemas laterales y raíz (normalizan las plantas enanas). A nivel molecular estimulan la síntesis *de novo* de algunas hidrolasas (por ejemplo proteasas, alfa amilasa, etc.) e intervienen en el metabolismo de ácidos nucleicos.

**Citocininas.**- Intervienen en la resistencia al calor y al frío y en el crecimiento de raíz y tallo. Estimulan la división celular. Inhiben la degradación del ADN y estimulan la síntesis del ARN.

Acido Abscísico.- Inhibe la germinación, el crecimiento de tallos y yemas laterales. Estimula la abscisión. Inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos e inhibe algunas actividades enzimáticas por ejemplo la de la alfa amilasa.

Etileno.- Estimula la germinación, la floración y la maduración de frutos, así como la síntesis de proteínas y de ARN.

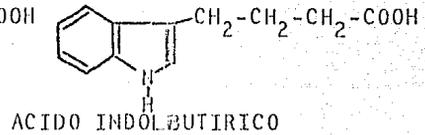
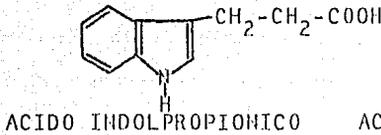
En este trabajo nos concretaremos al estudio de las auxinas y algunos de sus efectos a nivel molecular, por lo que a continuación se describirá con más detalle algunos conocimientos que se tienen acerca de estos fitorreguladores.

## 2.- AUXINAS SINTETICAS.

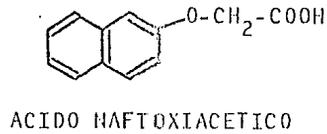
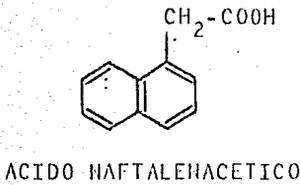
Después del descubrimiento de que el AIA es el principal compuesto responsable de la actividad auxínica, los investigadores en este campo empezaron a examinar una serie de compuestos con estructura química similar para determinar si poseían también propiedades reguladoras del crecimiento vegetal. La naturaleza química de los compuestos con actividad auxínica resultó ser muy variada. Dentro de estos compuestos se pueden mencionar derivados del ácido indolacético, ácidos arilacéticos (por ejemplo el ácido fenilacético, el naftalenacético, etc.), ácidos arilcarboxílicos (como el ácido benzoico y sus derivados), ácidos fenoxiacéticos, ácidos naftoxiacéticos, ácidos picolínicos, ácidos cinámicos, etc. (Fig. 4) (6,7,8).

Gran parte de estas auxinas sintéticas, por ejemplo los clo-rofenoxiácidos, se usan actualmente como herbicidas selectivos en la Agricultura (9).

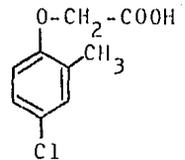
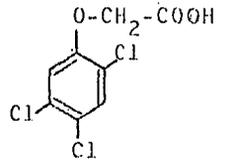
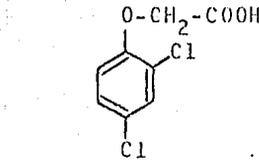
ACIDOS  
INDOLICOS



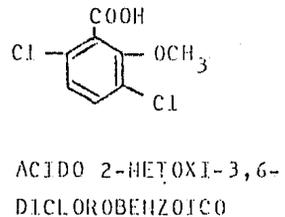
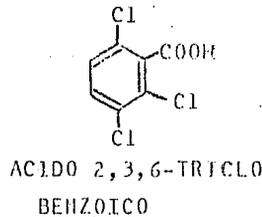
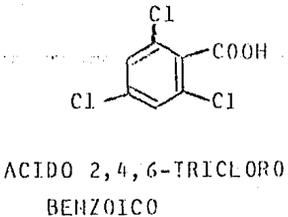
ACIDOS  
DERIVADOS DEL  
NAFTELENO



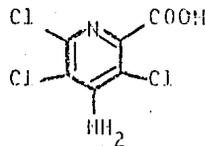
CLOROFENOXI  
ACIDOS



ACIDOS  
BENZOICOS



ACIDOS  
PICOLINICOS



### 3.- METABOLISMO DE AUXINAS.

Puesto que el control en la concentración del AIA en una planta se da por una regulación entre las velocidades de biosíntesis y de degradación del AIA, es necesario revisar brevemente estos procesos (10).

#### 3.1.- Biosíntesis del AIA.

La hipótesis más aceptada (6,7) sugiere que el AIA es sintetizado a partir del triptofano mediante dos posibles vías (Fig. 5). En una de ellas el triptofano sufre una reacción de transaminación produciendo ácido 3-indolpirúvico, el cual se descarboxila para dar indolacetaldehído y éste se oxida a ácido indol-3-acético. Otra posibilidad que se ha encontrado es que el triptofano se descarboxile directamente a triptamina y ésta se oxide a 3-indolacetaldehído que finalmente producirá el ácido indol-3-acético. Se ha propuesto que una o ambas vías pueden estar funcionando dependiendo de la planta y en algunos casos del tejido. También se ha encontrado en ciertas plantas algunos compuestos como el indol-etanol en pepino o el indolacetonitrilo en algunas crucíferas que pueden transformarse en indolacetaldehído y AIA respectivamente (6).

#### 3.2.- Catabolismo de auxinas.

##### 3.2.1.- Oxidación del AIA.

Desde hace tiempo se demostró que el AIA puede oxidarse enzimáticamente en plantas (6,7). Los productos de la acción de la AIA oxidasa son metilén-oxindol y el indolacetaldehído (Fig. 6). Se ha encontrado que la actividad enzimática es estimulada por

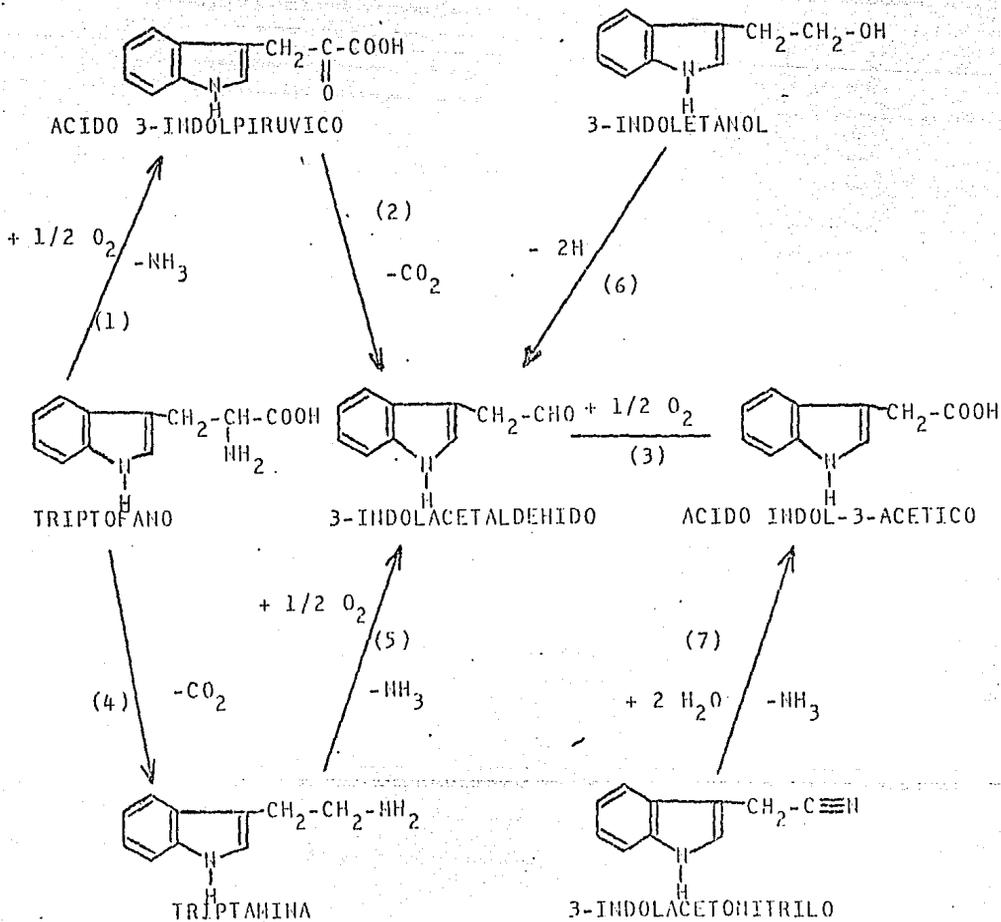


FIGURA 5 VIAS DE BIOSINTESIS DE LA AUXINA (AIA). (6)

ENZIMAS: (1) TRIPTOFAN TRANSAMINASA, (2) INDOLPIRUVATO DESCARBOXILASA, (3) INDOLACETALDEHIDO DESHIDROGENASA, (4) TRIPTOFANO DESCARBOXILASA, (5) AMINO OXIDASA, (6) INDOLETANOL OXIDASA, (7) NITRILASA

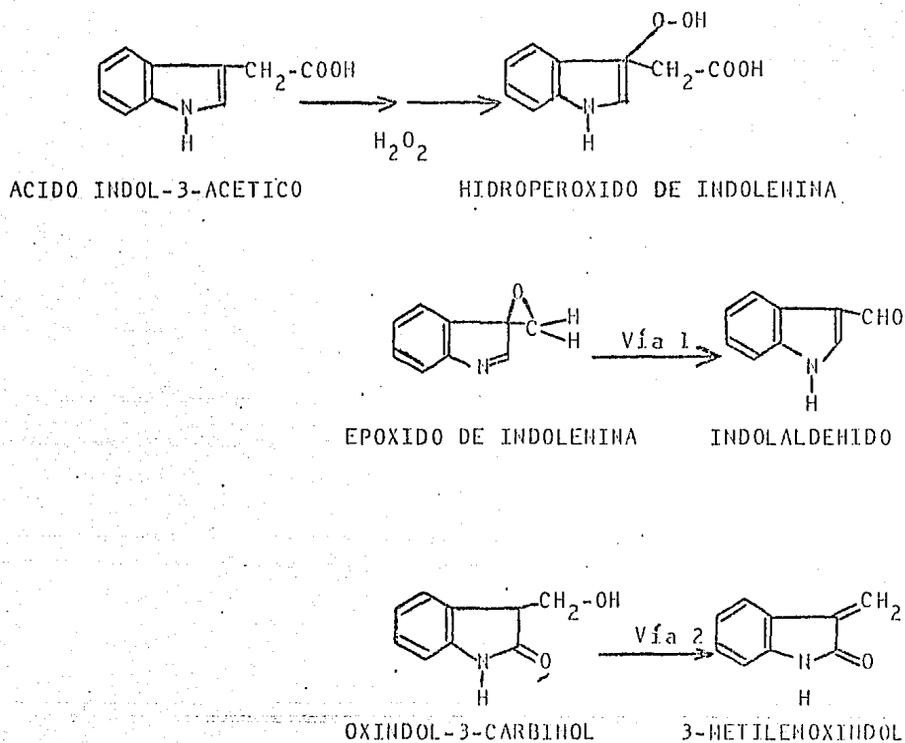


FIGURA 6 CATABOLISMO OXIDATIVO DEL AIA CATALIZADO POR PEROXIDASA Y AIA OXIDASA (6).

monofenoles e inhibida por orto difenoles, estos resultados y el hecho de que en plantas se encuentren compuestos fenólicos en abundancia ha llevado a sugerir que estos compuestos pueden funcionar *in vivo* regulando la destrucción de auxinas (6).

### 3.2.2.- Conjugación de AIA.

El término "auxina unida o conjugada", se refiere al compuesto en el que la auxina se encuentra unida covalentemente a una molécula sustituyente. Thimann fue el primero en sugerir que parte del AIA de las plantas se encontraba "unido" y posteriormente Overbeek encontró que sólo aproximadamente 5 % del AIA se encuentra en forma libre o disponible, en tanto que la mayoría se encuentra unido (11) (Fig. 7).

La "auxina unida" podía separarse en dos fracciones: una insoluble en agua y la otra soluble en agua y se podía liberar el AIA por hidrólisis (10,11). Se ha sugerido que las "auxinas conjugadas" pueden considerarse como formas de almacenamiento o detoxificación (11). Hamilton ha aislado y caracterizado las "auxinas conjugadas" de ejes de maíz, encontrando que se trata de ésteres glucosídicos del AIA (se han identificado entre otros, derivados de glucosa, arabinosa, mio-inositol, etc.). Posteriormente se han identificado derivados similares en otras plantas (11). También se han reportado derivados de aminoácidos (aspártico y glutámico) en una gran mayoría de tejidos, al parecer estos derivados se forman principalmente al aplicar AIA exógeno (como productos de detoxificación).



De hecho se ha encontrado que para plántulas de maíz de 4 días, la fuente de AIA del endospermo son los conjugados del AIA y no los precursores inmediatos triptofano y triptamina (10).

### 3.2.3.- Conjugación de auxinas sintéticas.

Andreae & Good (11) extendieron los estudios del metabolismo del AIA a las auxinas sintéticas e identificaron conjugados del 2,4-D con el aspártico. Holley (11) encontró en chícharo que el metabolito principal del 2,4-D era un glucósido hidroxilado en el anillo. En avena se identificó el éster de glucosa. Estos derivados también se han identificado en cultivos de soya (12). También se han encontrado derivados aminoacilados y conjugados del 2,4-D con lignina en cultivos de soya y trigo (12,13).

### 4.- TRANSPORTE DE AUXINAS.

El transporte de auxinas juega un papel regulatorio importante durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las evidencias sugieren que es un factor que controla procesos tales como la elongación celular, los tropismos, la diferenciación vascular, etc..

Desde que en 1928 Went descubrió el transporte polar de las auxinas, dos preguntas han intrigado a los fisiólogos vegetales: Cómo se logra la polaridad del transporte de auxinas? y Cuál es su significado? .

De acuerdo a la concepción clásica del transporte de auxinas, éstas se mueven en el citosol y se secretan en el extremo inferior de cada célula mediante un acarreador en un proceso de-

pendiente de energía. Apoyan esta proposición las siguientes evidencias: a) el fitorregulador se mueve hacia abajo de la planta con una velocidad de 10-20 mm/h (plántula y raíces); b) el movimiento polar es al menos en parte, independiente de la orientación del tejido y del gradiente de concentración y c) es rápidamente reversible y fuertemente afectada por las condiciones metabólicas. En este modelo se supone que el acarreador depende directamente de la energía metabólica para efectuar el transporte activo (14).

Recientemente Rubery, Sheldrake y Raven han sugerido una teoría alterna para el transporte de auxinas, la difusión quimiosmótica polar (14,15). Según esta teoría las células son más permeables a las moléculas de auxina sin disociar que a las moléculas disociadas y pueden acumular auxinas cuando el pH del citosol es mayor que el de la pared. La polaridad se alcanza si la relación de permeabilidad del anión con respecto a la auxina sin disociar es ligeramente mayor en el extremo inferior de la célula. Se ha sugerido que en este proceso podría estar involucrado un acarreador. A diferencia de la teoría convencional que sugiere que hay un transporte activo, esta teoría propone que el transporte de auxinas es termodinámicamente favorable y que la energía metabólica se emplea para mantener el gradiente quimiosmótico y la permeabilidad polar.

Las evidencias experimentales apoyan el hecho de que el AIA penetra más fácilmente a la célula en su forma no disociada y que

la incorporación de auxina se incrementa al disminuir el pH del medio. Esta nueva teoría da explicaciones sencillas a fenómenos que no se podían explicar fácilmente por la teoría del transporte activo, entre ellos la inhibición del transporte por compuestos que inhiben específicamente el eflujo e influjo del AIA, por ejemplo el ANF (ácido naftilftalámico) y el ATIB (ácido triiodobenzoico) (16,17).

#### 5.- EFFECTOS DE LAS AUXINAS.

La aplicación exógena de fitorreguladores a los tejidos es uno de los métodos más comunes en la investigación del modo de acción de dichas sustancias. El razonamiento se basa en la idea de reemplazar la auxina endógena por la exógena, de la cual se puede controlar su nivel y medir el efecto producido (1).

En el caso de los reguladores del crecimiento vegetal se presenta el problema de que no existe una separación definitiva entre la célula productora y la célula blanco, más aún pueden existir distintos sitios de producción del regulador. Otra dificultad de los tejidos vegetales es que cada célula contiene representantes de todos los fitorreguladores conocidos y estos compuestos interaccionan de manera distinta con el regulador exógeno dependiendo de sus niveles y del estadio fisiológico. A pesar de estas dificultades, la aplicación exógena de fitorreguladores a tejidos vegetales es una herramienta poderosa en la investigación en este campo (1).

Se cree que probablemente todos los procesos de una planta se encuentran afectados por los reguladores del crecimiento, sin

embargo a continuación se mencionarán tan sólo los efectos más característicos de las auxinas en los cuales se basa el presente estudio.

#### 5.1.- Las auxinas en la elongación celular.

Las células vegetales se encuentran limitadas por la pared celular, por lo tanto para que la célula pueda elongarse, debe haber un incremento en el área de la pared celular. Este fenómeno empezó a llamar la atención de los investigadores desde los primeros experimentos de Darwin y posteriormente se intensificó al encontrar Went que las auxinas son las sustancias responsables de la elongación celular en coleoptilos de avena. De hecho se ha considerado que la respuesta de elongación celular inducida por auxinas es la acción más característica de estos fitorreguladores y muchos de sus bioensayos se basan en esta respuesta (6,7,18).

La pared celular consiste de una red de microfibrillas de celulosa que están entrecruzadas por otros polisacáridos, Albersheim ha realizado estudios de la composición de la pared celular en sicómoro, encontrando que está compuesta principalmente por arabinanos, arabinogalactanos, celulosa, arabinósidos, ramnogalacturonanos, xiloglucanos y proteínas. Albersheim ha elaborado un modelo para la expansión celular inducida por auxinas, en el que se propone que para que la pared celular se elongue es necesario que las fibrillas de celulosa sean capaces de deslizarse entre sí y que después de hacerlo se formen nuevamente los entrecruzamientos entre las mismas (6).

De acuerdo a lo anterior, para que exista elongación celular es necesario que primero haya relajamiento de la pared celular (6). Hipotéticamente la relajación puede deberse a cambios en la síntesis de la pared celular o a un rompimiento de ciertos enlaces entre los polisacáridos constituyentes de la misma mediante ciertas hidrolasas (1,6).

Para explicar la elongación celular causada por auxinas se han propuesto dos hipótesis que hasta hace poco tiempo se consideraban incompatibles. La primera de ellas surgió en la década de los 60 y se conoce como hipótesis de la expresión genética, fue propuesta por Key y colaboradores (18). Esta hipótesis sugería que las auxinas actúan en algún paso de la transcripción y/o traducción, se basaba en experimentos en los que se medía el estímulo en la elongación de segmentos de coleótilos de avena, epicotilos de chícharo e hipocótilos de soya producida por la adición de auxina exógena. En estos experimentos se observó que en presencia de inhibidores de la transcripción y/o traducción, tales como la actinomicina D o la cicloheximida, la auxina exógena era incapaz de estimular la velocidad de elongación, resultado que apoyaba esta hipótesis. A lo largo de la década de los años 1960-1970 se reportaron un gran número de experimentos de este tipo, aunque la interpretación de éstos es difícil ya que siempre queda la posibilidad de que la inhibición del crecimiento se deba a eventos no relacionados directamente con la acción auxínica. En 1969 esta hipótesis fue puesta en entredicho debido a los experimentos efectuados por Evans y Ray (18), estos autores pre-

sentaron una técnica que les permitía seguir minuto a minuto el crecimiento de coleoptilos; los resultados indicaron un período de adaptación de 10 minutos en segmentos de coleoptilo a los que se había eliminado la auxina endógena. El principal argumento en contra de la hipótesis de la expresión genética fue que el período de adaptación observado era muy corto para permitir alguna modificación en la síntesis de proteínas. En su época este argumento fue lo suficientemente persuasivo para hacer que esta hipótesis se desechara. La carencia de una hipótesis fue cubierta por Cleland y Hager, quienes llegaron a una proposición bastante sencilla, según la cual la acidificación de la pared celular podía mediar la acción auxínica. Esta hipótesis conocida como hipótesis del crecimiento ácido (19), propone, al menos para la respuesta a corto plazo, el siguiente mecanismo: la auxina llega a su sitio receptor en la célula y al interaccionar con él, produce la expulsión de protones a la pared celular provocando la disminución del pH, lo que causa la activación de algunas enzimas que tienen pH óptimo ácido. Las enzimas activadas son a su vez capaces de romper enlaces de los polisacáridos constituyentes de la pared y producir una relajación de la misma. Existen dos tipos de evidencias que apoyan esta hipótesis: a) la inducción de la elongación celular por auxinas en tejido blanco puede ser sustituida por protones exógenos (18,20), el uso de amortiguadores con pH mayor de 6 en el medio externo inhibe la elongación celular inducida por auxinas, bien e incluso como se ha podido demostrar que las auxinas inducen la acidificación del medio extracelular.

lular en tejidos blanco a auxinas. La demostración de estos fenómenos no ha sido siempre fácil, debido a que la cutícula de los tejidos representa una barrera de permeabilidad a protones y amortiguadores. Debido a lo anterior los experimentos realizados recientemente se han efectuado en segmentos sin cutícula. Por otra parte los estudios cinéticos iniciales indicaban que, contrariamente a lo esperado, la inducción de excreción de protones era posterior a la inducción de la elongación, sin embargo estos resultados son poco confiables ya que la detección de protones puede hacerse sólo después de que éstos difundan hacia el electrodo en una cantidad suficiente para ser medidos. Jacob y Ray (21), realizaron experimentos más precisos en los que se midió, mediante un microelectrodo, el efecto de las auxinas en el pH del espacio de la pared y su correlación con la elongación en segmentos de tallo de chícharo y coleoptilos de maíz. Los resultados indican que las auxinas producen una disminución en el pH de la pared en ambos tejidos; en los coleoptilos de maíz después de un lapso de doce minutos, llegando a disminuir una unidad de pH en treinta minutos; la respuesta en chícharo se observó después de 15-18 minutos del tratamiento con auxinas, disminuyendo 0.9 unidades de pH en cuarenta minutos. Por otra parte la elongación estimulada por auxinas aparece en maíz después de un período adaptativo de 18 minutos, en tanto que en chícharo se observó después de 21-24 minutos de la aplicación de auxinas. Los estudios de la cinética de excreción de protones inducida por auxinas en segmentos de coleoptilos de avena, indican que ésta se

inicia después de un período de adaptación de 14 minutos, alcanzando el pH óptimo de 5 en aproximadamente 20-30 minutos (22). En el caso de la fusicoccina una toxina fúngica que induce también la elongación de las células, se encontró que provoca la excreción de protones después de un minuto de aplicada llegando al pH óptimo de 5 en 5-8 minutos. El KCN, que inhibe la elongación celular en 3-5 minutos, detiene la excreción de protones en menos de un minuto, por lo que el pH del espacio de la pared se incrementa lentamente. Estos resultados apoyan la hipótesis del crecimiento ácido, según la cual la auxina produce una excreción de protones que precede a la respuesta de elongación celular. A pesar de estas evidencias aún no se conoce el mecanismo molecular de la acidificación de la pared inducida por auxinas.

En 1975 Vanderhoef (18) encontró, al estudiar la cinética de elongación inducida por auxinas, en explantes de tejido, que se encontraban dos máximos de velocidad de elongación a distintos tiempos. El incremento en la elongación se detecta después de 12.4 minutos, alcanzándose un máximo después de 29.1 minutos, con una velocidad de 0.57 mm/h; esta primera fase de elongación se debe a la relajación de la pared celular. Si únicamente hubiera relajación celular la elongación sería transitoria con una duración de alrededor de 78 minutos, sin embargo, las auxinas inducen también la formación de compuestos requeridos para un crecimiento sostenido y son éstos los que intervienen en la segunda fase del crecimiento empezando a aparecer alrededor de los 35 minutos y alcanzándose un estado estacionario a los 104 minutos

con una velocidad de 0.54 mm/h .

La existencia de estas dos fases de crecimiento en respuesta a auxinas se apoya en los siguientes resultados: a) las citocininas que inhiben la elongación celular, inhiben la segunda respuesta pero no la primera; b) la elongación inducida por protones se asemeja a la primera respuesta, o sea que la velocidad de crecimiento aumenta y disminuye sin alcanzar un estado estacionario; c) los análogos de auxinas pueden separar temporalmente las dos respuestas.

En base a los resultados anteriores Vanderhoef ha hecho una reevaluación de la hipótesis de la expresión genética y de la hipótesis del crecimiento ácido y ha llegado a la conclusión de que no son incompatibles. Todos los datos disponibles pueden explicarse si se supone que las auxinas regulan tanto la relajación de la pared celular, durante la primera etapa de la elongación, como la producción de materiales requeridos para mantener la elongación, en la segunda etapa.

De esta manera los argumentos en contra de la hipótesis de la expresión genética son válidos únicamente en la primera etapa, en tanto que la segunda fase resulta fuertemente inhibida por actinomicina D. Además los experimentos de Zurfluh y Guilfoyle (23) en los que se observan cambios cualitativos en los patrones de proteínas sintetizadas en presencia de auxinas en segmentos de hipocotilos de soya apoyan esta hipótesis. Otra evidencia que hace reconsiderar la hipótesis de la expresión genética es la de que se han podido detectar cambios en la expresión genética de eucariotes en lapsos de 10-15 minutos (18), como es el caso de

las proteínas inducidas por el *shock* de calor en *Drosophila melanogaster* (18).

Recientemente Hanson y Trewavas (24) ha reconsiderado la acción de auxinas como promotoras características de la elongación celular, ya que la fusicoccina actúa con mayor eficiencia y rapidez en este fenómeno, sin embargo al parecer la fusicoccina y la auxina inducen la excreción de protones por mecanismos distintos, en tanto que la primera activa directamente la ATPasa que interacciona cambiando  $K^+/H^+$ , el fitorregulador lo hace de manera indirecta, es decir no interacciona directamente con la ATPasa (25). Los experimentos de la influencia de cicloheximida en la elongación celular inducida por auxina o fusicoccina en segmentos de chícharo, indican que los niveles de cicloheximida que inhiben completamente la síntesis de proteínas suprimen los efectos del AIA en la elongación celular. En el caso de la fusicoccina se encontró que la cicloheximida inhibió sólo parcialmente (70 %) el crecimiento y la excreción de protones, sugiriendo que la toxina no depende directamente de la síntesis *de novo* de proteínas en tanto que el AIA si lo hace (26).

## 5.2.- Efecto de las auxinas en el metabolismo de carbohidratos.

El primer paso en el crecimiento de una célula vegetal reside como ya se ha mencionado en la relajación de la pared de la célula, después de lo cual la elongación se efectúa bajo la influencia de la turgencia. A pesar de que no se conoce exactamente el proceso de la relajación, existen diversos estudios en los

que se ha observado que las auxinas influyen en el metabolismo de los carbohidratos de la pared. Así, por ejemplo, se ha observado que la estructura de los polisacáridos de la pared se altera en coleoptilos de avena por efecto de las auxinas (27), incluso se ha observado una disminución en el peso molecular de hemicelulosas inducido por auxinas (28). Existen indicios de que la estructura química de la pared celular varía con la planta. La fracción de polisacáridos no celulósicos de la pared de una monocotiledónea es rica en arabinosa, xilosa y glucosa, en tanto que en una dicotiledónea se encuentra una gran proporción de galactosa (29). Se ha observado que uno de los cambios más importantes causados por auxinas en la pared de coleoptilos de avena es la disminución específica de  $\beta$  1,3: 1,4 glucanos. Además de un pequeño incremento en las cantidades de arabinosa y xilosa que pueden constituir glucuronoarabinoxilanos (29).

Por otra parte se ha encontrado que las auxinas regulan la actividad de diversas enzimas involucradas en la síntesis y degradación de carbohidratos de la pared, entre éstas se pueden mencionar  $\beta$  1,3 glucanasas, dextranasas, las 1,3 y 1,4  $\beta$  glucán sintetasas, pectinesterasas y celulasa (1, 30, 31).

En algunos casos como el de la celulasa existen evidencias que sugieren que las auxinas inducen la síntesis *de novo* de la enzima (32).

Para establecer el papel que juegan estas enzimas reguladas por auxinas en la relajación de la pared es necesario efectuar un estudio de su regulación por estos fitorreguladores para ver si preceden o no a la elongación celular inducida por auxinas.

### 5.3.- Las auxinas y la diferenciación celular.

El papel de las auxinas como un factor regulatorio en la diferenciación celular no se descubrió sino hasta después del establecimiento del efecto de estos fitorreguladores en el crecimiento de plántulas y regeneración de la raíz. Una razón de esto fue el que se pensaba en las auxinas únicamente como reguladores del crecimiento y sólo después de observar su multiplicidad de efectos se percataron de su acción en la diferenciación.

En 1952 Jacobs hizo hincapié en la propiedad de las auxinas de moverse en la planta con polaridad basipetálica y encontró que cuando se cortan hileras de xilema en un tallo joven o en una hoja, las células traqueidales regeneran con una polaridad estrictamente basipetálica. En experimentos posteriores se ha confirmado la hipótesis de que las auxinas son un factor limitante en la diferenciación durante la regeneración del haz vascular (33).

Por otra parte se ha mencionado anteriormente que las auxinas están directamente involucradas en la inducción y mantenimiento de cultivos de tejidos vegetales y que el balance auxina/citocinina es uno de los factores que intervienen en la rediferenciación de estos tejidos durante la regeneración de la plántula (1-5).

### 5.4.- Efectos de las auxinas en ácidos nucleicos.

Los efectos producidos por las auxinas involucran cambios en las proteínas sintetizadas. Debido a que las proteínas son el resultado final de una serie de eventos en que participan la transcripción, traducción y modificaciones posttraduccionales.

como eventos colaterales, se ha dado gran atención a la participación de las auxinas en dichos procesos (35). A pesar de que existe un gran número de reportes de cambios en ácidos nucleicos inducidos por auxinas (34, 35), no se ha podido integrarlos, hasta la fecha, en una hipótesis única que explique el mecanismo de acción de estos fitorreguladores en el control de estos eventos. A continuación se presentarán algunos de los resultados obtenidos en este campo.

En 1953 Silberger & Skoog encontraron que el AIA aumentaba la división celular y el contenido de ADN en cultivos de médula de tabaco (35). en epicotilos de lenteja se encontró una correlación entre la elongación celular inducida por auxinas y la síntesis de ADN, sin embargo, en coleoptilos de maíz y en alcachofa no se encontró dicha correlación ya que la elongación fue insensible al inhibidor de la síntesis del ADN. Debido a los resultados contradictorios no existe una opinión generalizada al respecto.

Existen varias evidencias de que el tratamiento de ciertos tejidos con auxinas producía un incremento en la transcripción (34, 35). La alteración producida por las auxinas puede deberse a que afecta la disponibilidad de molde, la actividad de las polimerasas, la iniciación, la terminación, etc. Los estudios en los que se ha tratado de establecer el mecanismo por el que las auxinas regulan la transcripción han revelado dos tipos de moléculas posiblemente involucradas: los receptores y las moléculas mediadoras; estas últimas se caracterizan porque se liberan o activan por las auxinas aunque al parecer no requieren de la presencia

del fitorregulador para su actividad biológica posterior.

Mathysse y Phillips trabajando con cultivos de tejidos de soya y tabaco y con yemas de chícharo, obtuvieron de nucleoplasmas de núcleos aislados de estos tejidos, una proteína receptora la cual en unión de la auxina estimuló la síntesis de ARN, tanto en núcleos aislados como en cromatina aislada (36). Los autores sugieren que se incrementa la disponibilidad del molde. El grupo de Libbenga y colaboradores no encontró aumento en la síntesis de ARN por auxinas en cultivo de tabaco (37). Mondal y colaboradores (38) aislaron del nucleoplasma de coco un factor proteico que en presencia de AIA se combina con el ADN para aumentar la transcripción y se sugería que el ARN recién sintetizado difería cualitativamente del sintetizado en ausencia de la auxina. Roy y Biswas (39) aislaron, mediante cromatografía de afinidad, una proteína no histónica que se unía con alta afinidad al complejo AIA-receptor citoplasmático.

En cuanto a las moléculas mediadoras, éstas se han aislado de plántulas de chícharo y maíz (40), así como de hipocotilos de soya (41). En estos trabajos se empleó cromatografía de afinidad con 2,4-D-lisina como ligando, para el aislamiento de estos mediadores. Estas moléculas aumentan la transcripción, Cherry (42) encontró que una molécula mediadora de hipocotilos de soya aumentaba la actividad de la ARN polimerasa II.

Los núcleos aislados de hipocotilos de soya tratados con auxinas (43), mostraron niveles de transcripción más altos que los controles. Dichos cambios estaban asociados con cantidades mayores de ARN y proteínas, así como con un nucleolo de mayor tamaño,

con una actividad de ARN polimerasa I incrementada 25 % y 2.5 veces en el caso de la ARN polimerasa II. Previamente se había encontrado que el 2,4-D aumentaba la actividad de ARN polimerasa, incrementaba el molde y alteraba el patrón de ARN sintetizado (44).

Recientemente la técnica de traducción en sistemas libres de células ha permitido estudiar la influencia de las auxinas en el nivel de ciertos ácidos ribonucleicos. En dichos estudios Verma (45) encontró que el tratamiento de epicotilos de chícharo con 2,4-D produjo un aumento de diez veces en el nivel de ARN<sub>m</sub> de celulasa, que precedía de 12-24 h al incremento en el nivel de celulasa, por lo que se concluye que el nivel del ARN<sub>m</sub> no es el único factor que regula la síntesis de celulasa sino que hay un control secundario sobre la traducción. Sin embargo, no se sabe si el incremento se debe a un aumento en la síntesis de proteína, a una modificación en su procesamiento y/o en su estabilidad.

Bevan (46) encontró en células de cultivos de frijol y soya que la resiembra producía un incremento en ciertos ARN<sub>m</sub>. Algunos de estos cambios se debían a la resiembra y otros eran dependientes de auxinas. En frijol se observó un aumento en proteínas de 15 000, 40 000 y 80 000 de peso molecular; en soya se alteraron proteínas de 35 000, 45 000 y 65 000 de peso molecular.

En estudios similares en tallos de chícharo (47), se encontró que el AIA produce un incremento en aproximadamente cinco ARN<sub>m</sub> distintos, algunos se incrementaban significativamente después de veinte minutos del tratamiento con AIA, otros después de treinta minutos y otros más después de dos horas. Los autores sugieren que las auxinas programan temporalmente la expresión genética.

Zurfluh y Guilfoyle (48,49) estudiaron el efecto de auxinas en las proteínas sintetizadas en hipocotilos de soya, para ello aislaron los ARN<sub>m</sub> sintetizados en presencia de auxinas y los trajeron en un sistema libre de células. El tratamiento con 2,4-D por sesenta minutos produjo un incremento de al menos diez productos de traducción *in vitro*. El tratamiento con AIA produjo exactamente las mismas alteraciones lo que apoya la proposición de que las auxinas sintéticas ejercen su acción mediante el mismo mecanismo que la auxina natural. Por otra parte se encontró que las proteínas sintetizadas por las secciones elongantes de hipocotilos de soya diferían cualitativamente de las sintetizadas en las secciones basales.

Respecto a los efectos no transcripcionales de auxinas ya se mencionó anteriormente que las auxinas parecen aumentar la traducción del ARN<sub>m</sub> de celulosa en epicotilos de chícharo (32). También hay evidencias de que el AIA incrementa la sintasa de etileno (50, 51).

Por otra parte se ha encontrado que las auxinas promueven la formación de polisomas en epicotilos de chícharo, así como en hipocotilos de soya (1).

#### 6.- MECANISMO DE ACCION DE AUXINAS.

Se ha propuesto que las auxinas, al igual que otros fitorreguladores, ejercen su acción fisiológica mediante la interacción o reconocimiento inicial de receptores específicos, los cuales al ser ocupados o activados por el fitorregulador desencadenan una serie de eventos bioquímicos y biofísicos que llevan a la respuesta observada (52).

La actividad biológica de los fitorreguladores está determinada por sus propiedades estructurales y a menudo estereoespecíficas. Debido a que es generalmente aceptado que las proteínas son capaces de reconocer estas diferencias estructurales tan sutiles entre moléculas pequeñas, se supone que los fitorreguladores a semejanza de las hormonas animales, poseen receptores proteicos. A pesar del gran número de investigaciones realizadas en este campo no se tiene a la fecha la información suficiente que permita caracterizar completamente dichos receptores y proponer un mecanismo de acción para las auxinas(52,53).

Las principales aproximaciones metodológicas en el estudio de receptores auxínicos provienen de campos afines, tales como los de receptores de hormonas animales, neurotransmisores, etc. (9). Dichos estudios incluyen experimentos de unión *in vitro* y requieren que el posible receptor se una a la auxina (ligando), con una especificidad, velocidad y afinidad consistentes con las características de la dosis-respuesta de dicha auxina(52,53,54).

Las pruebas de unión *in vitro* consisten en dejar equilibrar el ligando con marca radiactiva (en nuestro caso la auxina), con la preparación en que se supone se encuentra el receptor. El ensayo se debe hacer en condiciones tales que tanto el ligando como el receptor sean estables. Una vez alcanzado el equilibrio se determinan las concentraciones de ligando libre y unido a proteína. Este ensayo requiere también que la auxina tenga una alta radioactividad específica, que esté muy pura y que no sufra transformaciones químicas durante el proceso (1); en este sentido debe tenerse especial cuidado con el AIA ya que en presencia de la

enzima AIA oxidasa se transforma a  $\beta$ -metilenoindol y este producto forma aductos covalentes con los grupos SH libres de proteínas (1).

Sin embargo, se requiere hacer una distinción entre la unión específica y las interacciones inespecíficas del ligando con otras proteínas. En general la determinación de sitios de unión inespecíficos se hace midiendo la radiactividad que permanece unida a la preparación en presencia de un gran exceso de ligando sin marca radiactiva ("frío") y el razonamiento es que el ligando "frío" competirá con efectividad por los sitios con alta afinidad pero no por los sitios con baja afinidad (aquellos en los que la unión total del ligando aumenta linealmente con el incremento en la concentración del ligando), por lo que la radiactividad unida a dichos sitios no disminuye en presencia de ligando "frío" (52, 53, 55). El parámetro que se emplea como un índice de la afinidad del ligando por la proteína es la constante de disociación  $K_D$ . El método más usado para determinar la  $K_D$  y el número de sitios de unión es el desarrollado por Scatchard, en el que se grafica la relación de la concentración de ligando unido sobre concentración de ligando libre en el eje de las ordenadas como función de la concentración de ligando unido en el eje de las abscisas. La pendiente de la recta obtenida nos da el valor de  $-1/K_D$  y el número de sitios de unión se obtiene del intercepto en las abscisas. Si la gráfica de Scatchard no resulta lineal sino cóncava se propone la existencia de varios sitios de unión. En la práctica no se considera relevante fisiológicamente una  $K_D$  mayor de 20 micromolar (9). Asimismo estos estudios requieren discriminar al receptor de otras

proteínas tales como las involucradas en el transporte y metabolismo de auxinas, las cuales tendrán características de unión similares a las del receptor. Para poder efectuar tal distinción se requerirá de realizar ensayos funcionales del posible receptor (52, 53).

A continuación se hará una breve revisión de los estudios efectuados en el campo de los receptores de auxinas. Para ello se hará una división de los sitios de unión (posibles receptores), de acuerdo a su localización celular en: membranales y no membranales.

#### 6.1.- Sitios de unión membranales.

Venis y Batt (56) encontraron en 1975 que las membranas de coleoptilos de maíz poseían dos sitios de unión al ácido naftalenacético (ANA). Uno de ellos llamado sitio I, que presentó una  $K_D$  de  $1.5 \times 10^{-7} M$  con 24 picomoles de sitios de unión/g de tejido; en tanto que el sitio II presentó una  $K_D$  de  $16.1 \times 10^{-7} M$ , con 110 picomoles/g de tejido. Según indican estudios de especificidad, el sitio II a pesar de tener menor afinidad por la auxina, tiene mayor especificidad y por tanto se esperaría que tuviera mayor relevancia fisiológica. La separación en gradiente de sacarosa indicó que el sitio II se localiza en una banda pesada (probablemente plasmalema y aparato de Golgi), en tanto que el sitio I se encontró en una banda más ligera (56).

En estudios posteriores, entre 1977 y 1979 (57, 58, 59), Venis efectuó el análisis electroforético de las proteínas de unión a auxina (sitios I y II) solubilizadas de membranas y encontró dos bandas predominantes de 56 000 y 54 000 pesos con

bandas de 25 000 y 27 000 daltones de peso molecular. En base a lo anterior se sugiere que se trata de proteínas diméricas.

El grupo de Hertel, Ray y Dohrman reportó en 1977 (60) que las membranas de coleoptilos de maíz poseían una sola clase cinética de sitios de unión, con una  $K_D$  del orden de  $5-7 \times 10^{-7} M$ . La unión fue insensible a altas concentraciones de sales monovalentes, sin embargo se inhibe con  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . La unión fue sensible a calor y proteasas, inactivándose reversiblemente por agentes reductores.

En 1977 Ray localizó, mediante centrifugación en gradiente de densidad y enzimas marcadoras, al sitio de unión a ANA en membranas de coleoptilos de maíz encontrándolo en el retículo endoplásmico rugoso principalmente. Asimismo localizó los sitios de unión al ácido Naftilftalámico, un inhibidor del transporte de auxinas y observó que se encuentran en una fracción membranal distinta, que muy probablemente corresponde a la membrana plasmática (54). La relevancia fisiológica de estos sitios de unión se ha probado mediante la comparación de la especificidad de unión a una serie de análogos (60) y la respuesta fisiológica de los mismos. La especificidad se midió como la capacidad que tienen estos análogos para competir con ANA por los sitios de unión y se observó que se incrementó en presencia de un factor del citosol denominado "factor del sobrenadante". Aunque se encontraron algunas discrepancias en algunos ácidos fenoxialquilcarboxílicos y en la unión de algunos fenoles, en general los datos de especificidad de unión correlacio

nan con la respuesta de elongación celular a auxina. En base a lo anterior se sugiere que estos sitios de unión pueden ser receptores de auxinas *in vivo*. Ray propone un modelo de acción auxínica según el cual la unión de la auxina a su sitio receptor en retículo endoplásmico induce el transporte de protones a la pared celular por la vía del retículo endoplásmico rugoso y el Aparato de Golgi; este modelo explica el periodo de adaptación que se observa durante la elongación inducida por auxinas (entre 10 y 20 minutos).

El factor del sobrenadante se aisló y caracterizó posteriormente (61), identificándose como una mezcla de benzoxazolinonas metiladas. Debido a que estos compuestos tienen una distribución limitada encontrándose sólo en algunas gramíneas, no se les puede atribuir un papel regulatorio general en la fisiología de auxinas.

Morré y Cherry (62) han aportado evidencias de que los sitios de unión a auxinas en hipocotilos de soya se localizan en la membrana plasmática, mediante el marcaje del plásmalema con  $I^{125}$  y la separación de las membranas en gradientes de densidad de sacarosa.

En un estudio muy cuidadoso de Dohrman, Hertel y Kowalik (63) en el que separan las distintas fracciones subcelulares, mediante un gradiente de densidad de sacarosa, se encontró con la ayuda de enzimas marcadoras que las auxinas se unían a distintas fracciones membranales. Estos estudios comprobaron que el principal sitio de unión saturable para ABA (sitio 1), se localizaba en el retículo endoplásmico. Sin embargo, se pudo

distinguir también un segundo tipo de unión específica a auxina (sitio II), que se localizó en el tonoplasto. Este segundo sitio no fue sensible al factor del sobrenadante y dió un patrón de especificidad similar al obtenido para el sitio I en presencia del factor del sobrenadante.

Por su parte Jacobs y Hertel han localizado otro sitio de unión en plasmalema al que denominaron sitio III de maíz (64).

Considerando la evidencia que propone que las auxinas ejercen su efecto en la elongación celular, promoviendo la excreción de protones del interior de la célula a la pared celular, Cross y colaboradores (65) decidieron comprobar la hipótesis de que la excreción de protones inducida por auxinas era debida a la activación de una ATPasa que bombea protones y que los sitios de unión a auxinas en maíz poseían dicha actividad de ATPasa. Con este fin se solubilizaron los microsomas que poseían los sitios de unión a auxinas (de coleóptilos de maíz) con Tritón X-100. Se encontró que bajo las condiciones experimentales usadas 1-1.5 mg de Tritón X-100/mg de proteína de membrana), se lograba la solubilización completa de los sitios de unión a auxina en tanto que aproximadamente 70 % de la actividad de ATPasa de  $Mg^{2+}$  y aproximadamente 85 % de la ATPasa de  $K^+$  permanecían insolubles (66). Esta distribución diferencial se interpretó como que los sitios de unión a auxina no poseen actividad de ATPasa. Otras posibilidades para la expulsión de protones inducida por auxina es que la ATPasa no interactúe directamente con la auxina o bien, que este involucrado otro mecanismo tal como una cadena de transporte de electrones.

En un estudio posterior de este grupo (67) se caracterizó la proteína de unión a auxina solubilizada de microsomas de coque de maíz y se encontró que esta proteína tenía las propiedades del sitio I, localizándose al igual que éste en el retículo endoplásmico. Asimismo se encontró que el patrón de especificidad a distintos análogos fue similar al encontrado para el sitio I, con excepción de que la proteína solubilizada presentó mayor afinidad por ANA. El análisis de la proteína solubilizada mostró que estaba constituida por una sola subunidad con un peso molecular de aproximadamente 80 000 daltones (en presencia de un inhibidor de proteasas, ya que en ausencia de éste se encontraron otras proteínas de menor peso molecular, lo cual indica que la proteína del sitio de unión sufre degradación). Al parecer la proteína solubilizada posee un grupo sulfhidrilo en su sitio activo. La constante de disociación para ANA fue de  $4.6 \times 10^{-8} M$  con 30 picomoles de sitios de unión/g de tejido fresco. También se encontró que dicha proteína se vio afectada por un factor del sobrenadante (69).

Debido a que Cross y Brigs no lograron detectar actividad de ATPasa en la proteína microsomal solubilizada, se decidió examinar los efectos de algunos inhibidores del transporte de electrones en la unión de ANA. Los resultados aunque no concluyentes sugieren que  $NH_3$  inhibe fuertemente en tanto que el KCN y el CO no.

El grupo de Libbenga y colaboradores (69,70 y 72), han logrado aislar de callos de tabaco un receptor unido a membranas y otro soluble, ambos de naturaleza proteica. El soluble presen

tó una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8} M$  para AIA, en tanto que el membranal dió una  $K_D$  de  $3.5 \times 10^{-6} M$  para ANA. Las condiciones óptimas de unión fueron pH de 7.5 y temperatura entre 24 y 30°C para el soluble, en tanto que se requería un pH de 5 y 36°C para el membranal. En estudios posteriores (71) se observó que no se puede detectar unión específica a ANA en protoplastos recién aislados de hojas de tabaco, en tanto que sí se detectaba en fracciones particuladas de dichas hojas. Estos resultados hicieron que los autores sugirieran que los sitios de unión a auxinas se localizan en la membrana plasmática y que se destruyen durante el aislamiento de los protoplastos. Debido a que no se logró la separación satisfactoria de las membranas en gradientes de sacarosa, no se pudo establecer con certeza la localización de los sitios. Después de cultivar los protoplastos de 3-4 días y coincidiendo con las primeras divisiones celulares se detectaron nuevamente los sitios de unión a ANA. La constante de disociación para dichos sitios fue de  $2 \times 10^{-6} M$  y el número de sitios aumentó durante el cultivo incrementándose en forma pronunciada durante la fase exponencial y permaneciendo constante durante la fase estacionaria. Esto ha hecho que se sugiera que éste es un buen modelo para el estudio de la síntesis de receptores así como de su translocación e incorporación a membranas (73).

Murphy ha reevaluado la unión de fracciones membranales a auxinas en maíz, mediante curvas ajustadas por computadoras y concluye que existe una sola clase principal de proteínas que unen a AIA, aunque no se descarta la existencia de múltiples sitios que difieran en especificidad (74).

Recientemente Trewavas (75) encontró que el tubérculo de alcachofa (que responde a auxinas experimentando división celular), posee una proteína de unión a auxina inducida por este fitorregulador ya que no se encuentra en el tejido sin tratar con auxina.

Tappeser, Wellnitz y Klambt (76) lograron aislar mediante cromatografía de afinidad diversas fracciones membranales de maíz. La medición de la  $K_D$  para ANA con distintos eluatos dió valores de  $2.5 \times 10^{-7} M$  y  $1.2 \times 10^{-7} M$ .

Los estudios de receptores de auxinas membranales se basan en los criterios de afinidad, sin embargo no se ha logrado avanzar más por ese camino. Recientemente Walton y Ray (77) han tratado de correlacionar los cambios en la sensibilidad a fitorreguladores inducidos por el desarrollo o por el medio ambiente con cambios en la concentración de los sitios de unión. Esta aproximación se usa en el campo de hormonas animales, la respuesta medida fue la disminución en la elongación de segmentos de mesocotilos de plántulas de maíz etioladas al ser iluminadas con luz roja. Se encontró que este cambio correlaciona con la disminución en el número de sitios de unión a auxina localizados en el retículo endoplásmico de membrana de mesocotilo.

Otros intentos en este sentido son los realizados por Narayan y Poovaiah (78,79) en fresa y pepino. En estos estudios se detectaron receptores membranales para auxinas con una  $K_D$  del orden de 10-20 micromolar a un pH de 3.75. Se observó que existe una buena correlación entre la unión *in vitro* de auxinas y el bioensayo de crecimiento del fruto. Asimismo es muy intere

sante que al parecer la unión del receptor a ANA presenta cooperatividad positiva a bajas concentraciones de  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  a  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ .

#### 6.2.- Sitios de unión no membranales.

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

Matthysse y Phillips observaron, en 1969 (36), que las auxinas no interaccionan directamente con la cromatina en la inducción de la síntesis del ARN, sino que requieren de un factor aislado del nucleoplasma de tejidos tratados con 2,4-D. En un intento por caracterizar este factor se encontró que era lábil al calor, que tenía un peso molecular de entre 20 000 y 200 000, en base a lo que se sugirió que se trataba de una proteína en sus formas monomérica y multimérica. Los autores han propuesto un modelo según el cual la auxina se une a la proteína y el complejo interacciona con la cromatina.

Mondal, Mandal y Biswas (38) encontraron, en núcleos de endospermo de coco, una proteína aceptora de AIA la cual en unión de este fitorregulador se unía a preparaciones de ADN *in vitro*, favoreciendo la síntesis de ARN distinto al sintetizado en ausencia del complejo.

En 1971 Venis aisló mediante cromatografía de afinidad, con 2,4-D-lisina como ligando, una fracción proteica de citoplasma de chícharo y maíz que activaba la síntesis de ARN en un sistema heterólogo (40).

Cherry y colaboradores aislaron de membrana plasmática de hipocotilos de soya, un factor proteico que se liberaba de la membrana específicamente por la acción de auxinas y que aumentaba la actividad de la ARN polimerasa II. Los autores sugieren que esta proteína funcione de manera similar *in vivo* (42,80).

Ihl ( ) ha encontrado una proteína no membranar que une auxina en cotiledones de soya. El AIA unido se desplaza por ANA y otros análogos de auxina. Sin embargo, en estos estudios no se determinó la  $K_D$  para estos compuestos.

Roy y Biswas (39) aislaron un receptor para AIA del nucleoplasma de endospermo de coco (nIRP), el cual tenía un peso molecular de 94 000 y una  $K_D$  de  $1.3 \times 10^{-5} M$ . Dicha proteína es capaz de unir AIA y 2,4-D pero no el análogo estructural inactivo ácido benzoico. Asimismo este grupo aisló otra proteína receptora de la cromatina de estas células (cIRP), la cual presenta mayor afinidad por AIA. En base a lo anterior se propone un modelo en el que la proteína cIRP funciona como aceptora del complejo AIA-nIRP para regular la transcripción.

El grupo de Libbenga y colaboradores (70,72) ha detectado y purificado parcialmente un receptor soluble de explantes de tabaco y de cultivos *in vitro* de este tejido. El peso molecular es de 75 000 a 300 000 en diversos experimentos, la  $K_D$  es de aproximadamente  $1 \times 10^{-8} M$ . Se ha propuesto que esta proteína está involucrada en la regulación de transcripción como parte de la respuesta general a herida.

Wardrop y Polya (81) describieron el aislamiento y purificación parcial de una proteína receptora semejante de las primeras

hojas de plántulas de chícharo enano. Estimaron la  $K_D$  hacia el AIA y ANA en  $1.1 \times 10^{-7}$  M y  $5.9 \times 10^{-6}$  M respectivamente y el peso molecular de la proteína en 315 000. El AIA unido se podía desplazar con análogos de auxina activos, en tanto que los inactivos no tuvieron efecto. En estudios más recientes (82), estos mismos autores identificaron a los sitios de unión solubles provenientes de chícharo y soya, como la enzima Ribulosa bifosfato carboxilasa (RBPC). Las  $K_D$  para AIA tienen valores de  $0.8 \times 10^{-6}$  M y  $1.3 \times 10^{-6}$  M para chícharo y soya respectivamente. Pruebas de especificidad (83) demuestran que análogos activos desplazan al AIA. Al parecer la actividad de unión a auxina puede perderse de manera reversible e irreversible sin afectar la actividad de RBPC. El hecho de que a RBPC sea una proteína muy abundante en cloroplasto hace pensar que no tiene un papel fisiológico directo en el mecanismo de acción de auxinas, aunque los autores proponen que pudiera estar involucrada en el almacenamiento y transporte de este fitoregulador.

Por otra parte Murphy (84) ha detectado compuestos del citosol de maíz con capacidad para unir AIA. Aproximadamente 70 % de la actividad de unión está dada por una proteína de peso molecular de 38 700 con una  $K_D$  de  $3.6 \times 10^{-6}$  M y 160 picomoles de sitios / g de peso fresco. Esta fracción mostró ser heterogénea en cromatografía de hidroxapatita y DEAE-Sephacel. Los estudios de especificidad de unión correlacionan con los efectos de estimulación del crecimiento para las auxinas probadas.

III

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1.- Reactivos.

Los siguientes reactivos fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis Mo): Sefarosa-BrCN, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, azul de coomassie G-250, azul de coomassie R-250, L-aminoácidos, albúmina de suero bovino, ácido naftalenacético, ácido indol-3-acético, Nonidet P-40.

De Merck, Sharp & Dohme (West Pont Pa) fueron: cloruro de sodio, peryodato de sodio, etanol absoluto, tris, -mercapto-etanol, cloruro de potasio, cloránfenicol, sacarosa, ácido tricloroacético, acrilamida (grado electroforésis), bis-acrilamida (N,N'-metiléndiacrilamida), dodecil sulfato de sodio, persulfato de amonio, glicina, azul de bromofenol, 1,4-dioxano, PPO (2,5-difenil oxazol), agar-agar, inositol, yoduro de potasio, clorhidrato de L-lisina, citrato de sodio, reactivo del fenol según Folín Ciocalteu.

De Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala Suecia) se obtuvieron: Sephadex G-10, azul de dextrán, Sepharose 4B, Sepharose-CL-4B, estándares de proteínas para determinación de peso molecular en geles de poliacrilamida (rango de bajo peso molecular de 14 400 a 94 000 daltones de peso molecular).

De J.T. Baker de México fueron: naftaleno, dimetilsulfóxido, hidróxido de potasio, sal disódica de EDTA.

De Técnica Química de México se obtuvieron: cloruro de magnesio, carbonato de cobre, ácido bórico.

De Bio-Rad se obtuvo: TEMED (N,N,N',N' tetrametiléndiamina).

De Aldrich Co. se obtuvo: 2-metil-4-clorofenol.

De Amersham se obtuvo: POPOP (1,4(2-(feniloxazolil))benceno).

De Química JVC de México se obtuvo: ácido clorhídrico, ácido acético glacial.

De Eastman Organic Chemicals se obtuvo: azida de sodio.

De Química Industrial Carmo se obtuvo: bicarbonato de sodio.

De LKB se obtuvieron las anfolinas pH 3.5-10.

De Eastman Kodak se obtuvieron: películas X-Omat S con interfoliado alternado XS-5, revelador y fijador para películas de rayos X.

El material radiactivo se obtuvo de The Radiochemical Centre Amersham England: mezcla de aminoácidos  $^{14}\text{C}$  de alta radiactividad específica (100 microcurios/ ml), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2- $^{14}\text{C}$ , 56 milicurios/ mmol, 50 microcurios) disuelto en tolueno; antes de usarse se evaporó el tolueno de la solución de 2,4-D, esto se logró con una corriente de nitrógeno y calentando a  $60^{\circ}\text{C}$ , después de lo cual se resuspendió en agua desionizada a  $\text{pH} = 8$ .

De Whatman se obtuvo: papel filtro y papel filtro DE-81 (intercambiador aniónico).

## 2.- Equipo.

Durante el presente trabajo se emplearon las siguientes centrífugas: Centrífuga MSE de baja velocidad, modelo LR-6; centrífuga Damon/IEC División modelo IEC.HN-S II; ultracentrífuga Beckman modelo L, ultracentrífuga Beckman modelo L5-75.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fischer. Los espectros de absorción en el IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 337. Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un espectrómetro Varian A-60.

Los reactivos se pesaron en una balanza analítica Mettler. El tejido se homogenizó en un homogenizador Polytron Kinematica CMBH (Lucerna Suiza). Para ajustar el pH de las soluciones amortiguadoras se empleó el potenciómetro Sargent-Welch Scientific Company modelo PBL.

Las incubaciones a temperatura y agitación constantes se efectuaron en un baño de agitación a temperatura constante de Lab Line Instruments, Inc.

El espectrofotómetro usado fue un Carl Zeiss modelo PHQ II.

El colector de fracciones para las columnas de cromatografía fue de LKB Ultrarac 7000.

La radiactividad se cuantificó en el espectrómetro de centelleo líquido de Packard Tri Carb Instruments Company 3255.

Para las electroforésis se usó el equipo en placa vertical modelo 220 y el secador de geles modelo 224, ambos de Bio Rad Laboratories. La fuente de poder empleada fue una T500 modelo 490.

### 3.-Soluciones.

En la preparación de las soluciones se empleó agua destilada y desionizada.

### 4.- Material Biológico.

A lo largo del presente trabajo se emplearon semillas de maíz, *Zea mays* L. variedad H-30. Híbrido cosechado en el área de Chapingo, cosechas de 1979 y 1980 donación del Dr. Joaquín Ortíz Corecóres del Centro de Genética del Colegio de Posgraduados de Chapingo. Los ejes embrionarios y los embriones se seccionaron del endospermo con la ayuda de un bisturí.

### MÉTODOS.

#### 1.- Síntesis del ácido 2-bromopropiónico(85).

Al ácido propiónico ( $2.68 \times 10^{-1}$  moles, 19.86 g, 20 ml) colocado en un matraz bola de una boca de 100 ml, equipado con un refrigerante en cuya parte superior se conectó una manguera a una trampa con solución de NaOH al 5 %; se le agregó el bromo ( $2.95 \times 10^{-1}$  moles; 47.14 g, 15.1 ml) en exceso de 10 %. Se le añadió lentamente y con agitación el tricloruro de fósforo (0.8 ml). La mezcla de reacción se calentó en baño de agua (a una temperatura entre 65 y 70°C), con agitación durante cuatro horas. La temperatura del baño se aumentó a 80°C aproximadamente y se continuó la reacción hasta desaparición del color del bromo (alrededor de 3 horas más). La mezcla de reacción se destiló a presión reducida en un equipo quickfit empleando una trampa de NaOH para atrapar el ácido bromhídrico desprendido.

Rendimiento: 30.7 g, 75 %.

Caracterización del producto de la reacción.

Punto de ebullición: 86°C, 3.5 mm de Hg aproximadamente.

I.R.  $\bar{\nu}$  max. (cm<sup>-1</sup>): -COOH 3000 (m); -C=O 1720 (f); -CH<sub>3</sub> 1470 (m), 1390 (d-m); -OH 1420 (m-d); -CO 1240 (d); -CBr 645(d).

2.- Síntesis del ácido 2(2-metil-4-clorofenoxi)propiónico (86).

El 2-metil-4-clorofenol (0.07 moles, 10 g) se añadió a una solución de NaOH (0.14 moles, 5.6 g en 15 ml de agua). El ácido 2-bromopropiónico (0.07 moles, 10.8 g) se agregó a la mezcla anterior y se dejó a reflujo durante veinticuatro horas. El producto se acidificó y se extrajo con solución de bicarbonato de sodio al 5 %. La fase acuosa, conteniendo el producto, se neutralizó (aparece turbidez) y se extrajo nuevamente con acetato de etilo. El disolvente se evaporó y el producto se recrystalizó de acetona-hexano.

Rendimiento: 3.5 g, 58.3 %.

Caracterización del producto de la reacción.

Punto de fusión: 92-93°C.

I.R.  $\bar{\nu}$  max. (cm<sup>-1</sup>): -OH 2950 (m); -C=O 1715 (f); -C=O 1235 (m); C=C 1500 (m-f); 1,2,4 trisustitución en el anillo 795, 880 (d).

R.M.H.  $\delta$  (ppm): -CH<sub>3</sub> 1.65 (d 3H); Ar-CH<sub>3</sub> 2.2 (s 3H); -C-H 4.75 (s 1H); Ar-H 6.4-7.2 (m 3H).

3.- Síntesis del ligando 2,4-diclorofenoxiacetamido- $\epsilon$ -L-lisina (2,4-D-lisina) (87).

El complejo lisina-cobre (0.017 moles, 6 g) preparado como

se indica anteriormente (87), se disolvió en agua, se enfrió en un baño de hielo a una temperatura de aproximadamente 10°C, se ajustó el pH entre 11 y 12 con una solución de NaOH concentrada y se añadió un poco de éter etílico.

A la mezcla anterior se le agregó el cloruro del ácido 2,4-D (0.0375 moles, 9 g, exceso de aproximadamente 10%), preparado según la técnica descrita (87), en pequeñas porciones, con agitación vigorosa y controlando el pH y la temperatura (tiempo de adición 30-60 minutos). La agitación se continuó durante 1-1.5 horas hasta no observar formación de más precipitado. El precipitado se filtró, lavándose con agua fría hasta que no se disolvió más reactivo (complejo lisina-cobre de color azul) sin reaccionar.

El complejo 2,4-D-lisina-cobre se suspendió en una solución de HCl 2 N, se calentó a 60°C y se le pasó una corriente de H<sub>2</sub>S para romper el complejo de cobre. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad en el rotavapor, recristalizándose de etanol - acetona.

Rendimiento: 4.9 g, 40 %.

Caracterización del producto de la reacción.

Punto de fusión: 241-243°C.

I.R.  $\bar{\nu}$  max. (cm<sup>-1</sup>): -NH 3350 (m); -COOH, -NH<sub>2</sub> aproximadamente 2910 (m-f); -COOH 1745 (m-f);  $\begin{matrix} \text{-C-NH-} \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$  1660 (f); -CH 1440 (m-f); 1,2,4 trisustitución en el anillo 845, 800 (m).

R.H.N.  $\delta$  (ppm): Ar-H 6.9-6.6 (m 3H); -O-CH<sub>2</sub>-C- 4.2 (s 2H);  
 HN-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- 2.95 (s 2H);  $\begin{matrix} \text{-CH-CH-COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$  3.8 (t 1H);  $\begin{matrix} \text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$

1.65 (2H);  $-(CH_2)_2-$  1.2 (m 4H).

#### 4.-Síntesis de la columna de cromatografía de afinidad.

El acoplamiento del ligando 2,4-D-lisina a la sefarosa se efectuó mediante dos métodos.

##### Método I.

Se adaptó la técnica descrita por March, Parikh y Cuatrecasas (88), como sigue:

Se pesaron 3 g de Sefarosa activada con bromuro de cianógeno, los cuales se lavaron en un embudo de vidrio poroso con 1 litro de HCl  $1 \times 10^{-3} M$  y posteriormente con 1 litro de agua, con el objeto de eliminar los estabilizadores dextrán y lactosa. El paquete de Sefarosa así tratado se resuspende en agua, aproximadamente 1.5 litros, se le añadió 10 ml de bicarbonato de sodio 0.2 M pH 9.5 y se ajustó el pH entre 9.5 y 10. La suspensión de Sefarosa se agregó a la solución del ligando y se dejó agitando con barra magnética a la mínima velocidad posible durante 20 horas a  $4^{\circ}C$ . La Sefarosa acoplada se filtró en un embudo de vidrio poroso y se lavó con las siguientes soluciones, agitando cuidadosamente con una espátula en cada lavado y evitando que se empaquetate.

- a) Acetato de sodio 0.1 M pH 4 con cloruro de sodio 0.5 M (250 ml).
- b) Urea 2 M con cloruro de sodio 0.5 M (250 ml).
- c) Bicarbonato de sodio 0.1 M pH 10 con cloruro de sodio 0.5 M (250 ml).

La Sefarosa acoplada se lavó con 2 litros de agua desioniz-

zada, se empaquetó, se resuspendió en 50 ml de agua desionizada con azida de sodio al 0.02 % p/v y se guardó en un recipiente sellado en el refrigerador.

#### Método II.

Se adaptó la técnica descrita por Liberatore, Isaac y Royer (89) como sigue:

Se midieron 25 ml de la suspensión de Sefarosa CL-4B, los cuales se lavaron con las siguientes soluciones:

- a) Acido acético 0.1 M (1250 ml).
- b) Bicarbonato de sodio 1 % p/v (1250 ml).
- c) Agua desionizada (1250 ml).

El paquete de Sefarosa se resuspendió en 250 ml de peryodato de sodio 0.01 M y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente el gel oxidado se lavó con agua en un embudo de vidrio poroso. Por otra parte se prepararon 250 ml de buffer de boratos 0.1 M pH.9 a los cuales se agregó el ligando 2,4-D-lisina hasta saturación (aproximadamente 455 mg). A la mezcla anterior se le añadió el gel oxidado y se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Posteriormente se agregaron 10 mg de borohidruro de sodio y se continuó la agitación por 20 minutos más. La sefarosa acoplada se filtró en un embudo de vidrio poroso y se lavó con las siguientes soluciones:

- a) Acido acético 0.1 M (1250 ml).
- b) Bicarbonato de sodio 1 % p/v (1250 ml).
- c) Agua desionizada (1250 ml).

El paquete de Sefarosa acoplada obtenida en el paso anterior

se resuspendió en 75 ml de agua desionizada y se guardó en un recipiente con una solución de azida de sodio al 0.02 % p/v en el refrigerador.

5.- Determinación del rendimiento del acoplamiento de ligando a la Sefarosa.

La determinación de la cantidad de ligando acoplado a la Sefarosa se realizó por espectroscopía directa en la región del ultravioleta, usando el coeficiente de extinción molar del ligando 2,4-D-lisina a la longitud de onda de máxima absorbencia, obtenido en un trabajo preliminar (87) ( $\epsilon = 1461 \text{ l/mol cm}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$ ).

6.- Determinación de la curva de decaimiento del ligando acoplado a la Sefarosa.

La cantidad de ligando acoplado en el tiempo cero (después de la reacción de acoplamiento), se tomó como el 100 %. La Sefarosa se guardó en el refrigerador en azida de sodio al 0.02 %. A los 11, 27, 36, 45 y 54 días se sacó la suspensión de Sefarosa, se lavó exhaustivamente en un embudo de vidrio poroso con agua desionizada, se dejó empacar la Sefarosa y se resuspendió en el mismo volumen inicial. Se tomaron alícuotas de la suspensión para medir su absorbencia y así mediante el coeficiente de extinción molar del complejo 2,4-D-lisina aplicando la ley de Beer determinar la cantidad de ligando que permanecía unido a la Sefarosa en función del tiempo.

7.- Determinación de la especificidad de la columna de cromatografía de afinidad.

Las semillas de maíz se esterilizaron externamente durante diez minutos en una solución de hipoclorito de calcio al 8 %. Posteriormente se lavaron abundantemente con agua corriente. Las semillas se sembraron en cajas de agrolita de 37 x 27 cm (aproximadamente 75 semillas por caja). Las cajas se colocaron en una cámara a una temperatura entre 25 y 35°C (dependiendo de la época del año) y se les dió un pulso único de luz durante 12 horas, con lámparas fluorescentes de 75 a 80 watts, después de lo cual se mantuvieron en oscuridad. A los cuatro días se colectaron 160 g de coleoptilos (de aproximadamente 3.5 cm de longitud). El tejido se congeló a -70°C. Los coleoptilos se homogenizaron con un volumen igual de buffer (tris-HCl 0.02 M y  $\beta$  mercaptoetanol 0.01 M pH 7.6) en un mortero preenfriado. El homogenado se filtró a través de seis capas de papel filtro de filtración rápida y el filtrado se centrifugó a 30 000 g durante diez minutos. La pastilla se desechó, en tanto que el sobrenadante se puso en contacto con la Sefarosa acoplada al ligando (por el método I) durante 30 minutos y se montó la columna. La columna se lavó con buffer de homogenización hasta que la absorbencia a 280 nm disminuyó a cero. Las proteínas retenidas se eluyeron con NaCl 1 M, se desalaron mediante su paso a través de una columna de Sephadex G-10 y posteriormente se aplicaron a una nueva columna de afinidad (de iguales características que la anterior), de la cual se eluyeron con un gradiente de 2,4-D de 0-50 mM. Como control de la especificidad de la columna se empleó albúmina de suero bovino, en cantidad equivalente a las proteínas retenidas en la columna

de afinidad provenientes de coleoptilos de maiz. La albúmina se pasó a través de otra columna de afinidad (de características iguales a las anteriores) de la cual se eluyó mediante un gradiente de 2,4-D de 0-50 mM.

8.- Determinación de proteínas.

Las proteínas eluidas de las columnas de cromatografía de afinidad, se cuantificaron por el método de azul de coomassie descrito por Bradford (90), que consiste en lo siguiente:

Se pesaron 100 mg del colorante azul de coomassie G-250, se disolvieron en 50 ml de etanol al 95 %. A esta disolución se agregaron 100 ml. de ácido fosfórico al 85 % (p/v), se agitó hasta de saparición de los grumos del colorante, se llevó a un volumen final de 1 litro y se filtró en papel de poro cerrado. La solución proteica (conteniendo entre 10 y 100 microgramos de proteína en un volumen de hasta 0.1 ml) se pipeteó en un tubo de ensayo y el volumen final del tubo se ajustó a 0.1 ml con el buffer tris-HCl 0.02 M,  $\beta$  mercaptoctanol 0.01 M, pH 7.6. Posteriormente se adicionaron 5 ml del colorante, el contenido del tubo se agitó en un Vortex por 5 segundos a velocidad máxima y se leyó la absorbencia a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora. Como blanco se empleó 0.1 ml del buffer al que se adicionaron 5 ml del colorante. Para obtener la curva patrón se empleó albúmina de suero bovino de 0-100 microgramos; se graficó la absorbencia a 595 nm en las ordenadas contra la cantidad de proteína en las abscisas (Fig. 8).

Se recomienda usar celdas de plástico debido a la tendencia

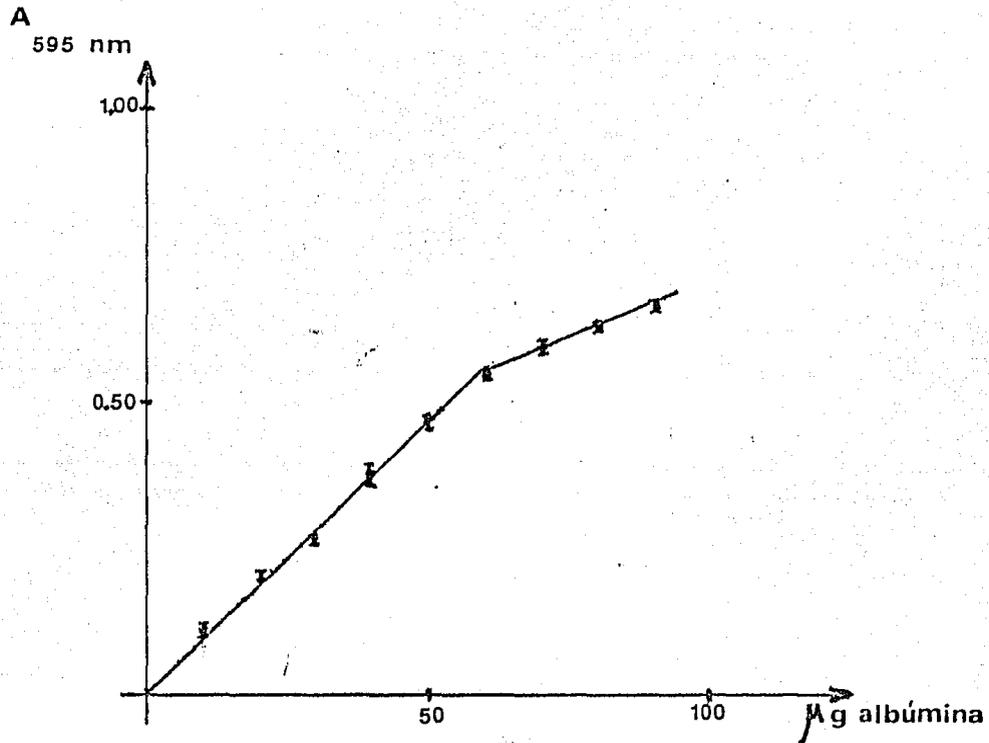


FIGURA 8 CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE AZUL DE COOMASSIE DESCRITO POR BRADFORD (90).

Cada punto es promedio de cinco determinaciones.

del complejo proteína-colorante de unirse al cuarzo ; en caso de usarse celdas de cuarzo, éstas deben lavarse inmediatamente después de usarse con detergente neutro.

Las proteínas de los homogenados para electroforesis se determinaron por el método de Lowry (91) que consiste en los siguientes:

a) Se prepararon 100 ml de una solución de carbonato de sodio al 2 % en NaOH 0.1 N (solución a).

b) Se mezclaron volúmenes iguales (solución b) de :

i) Sulfato de cobre al 1 %.

ii) Tartrato de sodio y potasio al 2 %.

Nota: Estas soluciones deben mezclarse inmediatamente antes de usarse ya que pueden precipitar.

c) Se preparó el reactivo I que consiste en mezclar 50 ml de la solución a y 1 ml de la solución b.

d) Se preparó la solución II que consiste en mezclar partes iguales del reactivo de Folin Ciocalteu y agua o bien el buffer indicado.

Para la determinación de proteínas se pusieron 0.5 ml de la solución problema en un tubo de ensayo (esta solución proviene de la muestra problema, la cual se precipitó con ATA al 5 % de concentración final; el precipitado se separó por centrifugación y se resuspendió en agua, ajustando el pH entre 7 y 8. A la solución problema se añadieron 5 ml del reactivo I y se agitaron en un Vortex a velocidad máxima por 5 segundos. Posteriormente se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos y se añadieron 0.5 ml del

reactivo II, seagitó y se dejó transcurrir treinta minutos más, después de lo cual se midió la absorbencia a 750 nm. La curva patrón se obtuvo usando albúmina de suero bovino y graficando la absorbencia a 750 nm en las ordenadas contra la cantidad de proteína en las abcisas. (Fig. 9).

9.- Determinación de la  $K_D$  del complejo receptor soluble - 2,4-D  $^{14}C$ .

La capacidad de unión del 2,4-D  $^{14}C$  por el sobrenadante pos ribosomal de ejes embrionarios de maíz se estimó adaptando la técnica descrita por Murphy (84), como sigue: se colocaron 1.5 ml del sobrenadante posribosomal de ejes embrionarios de maíz (0.15 mg de proteína) en tubos de ensayo. Al sobrenadante se le adicionó 2,4-D  $^{14}C$ , se probaron ocho concentraciones que iban de 10 a 500 nM; a la mezcla anterior se agregó buffer tris-HCl 50 mM pH 7.6 hasta llegar a un volumen final de 2 ml, se agitó y se dejó equilibrar durante diez minutos, después de lo cual se saturó con  $(NH_4)_2SO_4$  a una concentración final de 75 %. Transcurridos 15 minutos se filtró la solución sobre membranas de Millipore (de 2.5 cm de diámetro y 0.45 micrómetros de poro) con vacío. El tubo que contenía la solución se enjuagó con una solución de  $(NH_4)_2SO_4$  saturado y el contenido se adicionó sobre el filtro anterior; las membranas se dejaron secar y se transfirieron a un vial de centelleo al que se adicionaron 10 ml de líquido de Bray para determinar su radiactividad.

El 2,4-D unido inespecificamente se determinó empleando 2,4-D sin marca en una concentración 500 veces superior en experimentos

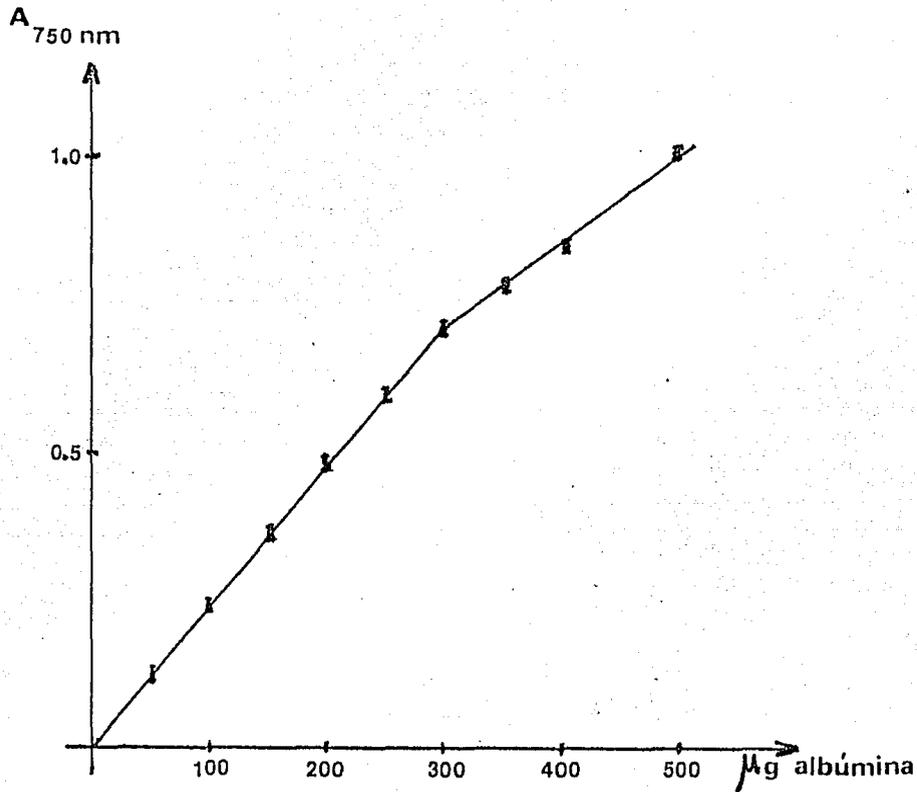


FIGURA 9. CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY (91).

Cada punto es promedio de tres determinaciones.

paralelos.

Se graficó la relación del 2,4-D unido/ libre en las ordenadas en función del 2,4-D unido en las abscisas y a partir de la recíproca de la pendiente se obtuvo la  $K_D$ .

10.- Determinación del tiempo de vida media del complejo receptor soluble-2,4-D  $^{14}C$ .

Se sembraron 60 semillas de maíz en frascos entre algodón (20 semillas/frasco). Se adicionó el buffer de imbibición (tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM, -mercaptoetanol 5 mM, sacarosa 0.25 M pH 7.6; 1 ml/semilla), se taparon los frascos con papel aluminio. Se dejaron imbibiendo durante 24 horas a 25°C. Transcurrido este periodo se seccionaron los ejes embrionarios de las semillas. Los pasos subsecuentes se realizaron a 4°C a menos que se indique otra cosa. Los ejes embrionarios se congelaron a -70°C por treinta minutos, posteriormente se homogenizaron con 2 ml del buffer de imbibición en un mortero preenfriado. El homogenado se filtró a través de seis capas de papel filtro y el filtrado se centrifugó a 199 500 g por 80 minutos. La pastilla resultante se desechó y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 con el fin de eliminar la auxina endógena y las benzoxazolinonas que se ha reportado que son el "factor del sobrenadante" de maíz que afecta la unión de auxinas a su receptor (61). Las fracciones proteicas eluidas de la columna con el buffer de imbibición se unieron y se usaron para la determinación del tiempo de vida media del complejo receptor - 2,4-D  $^{14}C$ , adaptando la técnica descrita por Keith, Brown y Srivastava (22),

Como se indica a continuación.

Se tomó una alícuota de aproximadamente 1 ml del homogenado pasado por Sephadex G-25, se puso en contacto con 2,4-D  $^{14}\text{C}$  (56 mCi/mmol) en una concentración final de  $1.94 \times 10^{-6}$  M, se dejó equilibrar la mezcla a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2-3 horas; transcurrido este período se dividió la mezcla en dos fracciones, una de 0.75 ml para las muestras y otra de 0.25 ml para el control. A la fracción de las muestras se les adicionó un exceso de quinientas veces de 2,4-D frío, con el fin de eliminar la unión inespecífica y al control se le adicionó un volumen equivalente del buffer; a partir de este momento se empezó a contar el tiempo. Se tomaron alícuotas de las dos fracciones anteriores a intervalos de tiempo durante un lapso de aproximadamente cuarenta minutos. Las alícuotas contenían de 100 a 130 microgramos de proteína. Se tomaron dos discos de papel filtro DEAE-celulosa (diámetro de 2.5 cm Whatman DE 81), se humedecieron por capilaridad en el buffer de imbibición y se insertaron en un filtro Millipore. Los filtros se lavaron con 20 ml del buffer con vacío, posteriormente se liberó el vacío y se aplicaron las alícuotas conteniendo la auxina marcada unida a sus proteínas de alta finidad. Después de exactamente un minuto de contacto con el papel filtro, se lavaron los discos con 50 ml del buffer (tiempo aproximado de lavado 2 minutos). Se dejaron secar con vacío por cinco segundos y después a la intemperie y se colocaron en los viales de centelleo con 1 ml de metanol y 10 ml del líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad. La radioactividad unida en ausencia de líquido frío

se tomó como 100 % de radiactividad ( control) y la disminución de cuentas retenidas en las muestras en presencia del ligando frío (sin marca), se expresaron como por ciento del control. Se graficó el por ciento de unión inicial en función del tiempo.

11.- Cuantificación de la radiactividad.

La cuantificación de la radiactividad se efectuó adicionando a las membranas, los discos de papel filtro o bien a las alícuotas de la muestra radiactiva 10 mililitros del líquido de Bray (93) cuya composición es la siguiente:

Naftaleno	60.0 g
PPO	4.0 g
POPOP	0.2 g
Metanol	100.0 ml
Etilén glicol	20.0 ml

Se adicionaron 500 ml de 1,4-dioxano; se agitó hasta disolución de los componentes y se aforó a un litro con 1,4-dioxano. Los viales se contaron en un contador de centelleo líquido en el canal de <sup>14</sup>C. Los resultados se dan en cpm (la eficiencia de conteo es de 82 %).

12.- Proteínas postribosomales de ejes embrionarios de maíz retenidas en la columna de afinidad.

Se aislaron 500 mg de ejes embrionarios de semillas de maíz, se pusieron a imbibir en un matraz Erlenmeyer entre dos discos de papel filtro humedecidos con 1 ml del buffer de imbibición tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM, HgCl<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, sacarosa al 2 % pH 7.6), que tenía además mezcla de aminoácidos

en concentración 30 micromolar y 10 microgramos/ml de cloranfenicol. A las 18 horas de imbibición a 25°C se les dió un pulso de aminoácidos marcados con <sup>14</sup>C (0.5 ml, 50 microcurios) por 6 horas más. A las 24 horas de imbibición se lavaron los embriones para eliminar la marca que no se incorporó, se congelaron a -70°C se homogenizaron en un mortero preenfriado con 5 ml de buffer de imbibición. El homogenado se filtró a través de seis capas de papel de filtración rápida, se centrifugó a 15 000 g por 30 minutos. La pastilla se desechó, el sobrenadante se recentrifugó a 200 000 g durante 75 minutos, la pastilla se desechó en tanto que el sobrenadante postribosomal se puso en contacto con la se farosa acoplada al ligando (aproximadamente 0.18 mg de ligando). Se montó la columna de afinidad y se lavó hasta que la absorbencia a 280 nm llegó a cero. Las proteínas retenidas se eluyeron con 30 ml del gradiente de auxina correspondiente (HCPP, 2,4-D, AIA y ANA). Las fracciones que contenían los picos de proteínas radiactivas se precipitaron con ATA al 10 %, se centrifugaron a 3 500 rpm . La pastilla resultante se resuspendió en aproximadamente 0.5 ml de agua y se le ajustó el pH entre 7 y 8 después de lo cual se sometieron a electroforesis en una y dos dimensiones.

13.- Efecto del HCPP en las proteínas sintetizadas en las primeras horas de imbibición.

Se aislaron 600 mg de ejes embrionarios de semillas de maíz, se dividieron en dos fracciones de 300 mg cada una.

Una de las fracciones de 300 mg de ejes embrionarios se colocó en un matraz Erlenmeyer de 25 ml entre dos discos de papel fil

tro humedecidos en 0.6 ml de buffer de imbibición tris-HCl 50 mM KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, sacarosa al 2 % pH 7.6; que contenía además mezcla de aminoácidos 30 M y cloranfenicol 10  $\mu$ g/ml. Los matraces se taparon con papel aluminio y se pusieron a incubar durante 18 horas en un baño de agua a 25°C. La otra fracción de 300 mg se colocó también en un matraz Erlenmeyer de 25 ml en condiciones similares a las de la fracción anterior sólo que contenía además 5 mg/l de HCPP. Transcurridas las 18 horas se añadió mezcla de aminoácidos marcados con <sup>14</sup>C (0.3 ml, 30  $\mu$ Ci). La incubación se continuó durante 6 horas más a 25°C. Los ejes se lavaron con 5 ml de buffer de imbibición y se congelaron a -70°C. Posteriormente los ejes embrionarios se homogenizaron en un mortero preenfriado con 1 ml de buffer de imbibición/100 mg de ejes. El homogenado se filtró a través de seis capas de papel de filtración rápida en un embudo Buchner y se centrifugó a 15 000 g durante 30 minutos. La pastilla se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 200 000 g por setenta y cinco minutos. El sobrenadante postribosomal de ambas fracciones se dividió en dos lotes, uno se usó como control y el otro se puso en contacto con la columna de afinidad (0.053 mg de ligando acoplados a Sefarosa/ 150 mg de ejes embrionarios). La Sefarosa se lavó con 0.5 ml del buffer de imbibición y las proteínas retenidas después del lavado se eluyeron mediante lavados con concentraciones crecientes de 2,4-D: un lavado con 0.5 ml de 2,4-D 15 mM; tres lavados sucesivos con 0.5 ml cada uno de 2,4-D 30 mM y un lavado con 0.5 ml de 2,4-D 50 mM. Las proteínas postribosomales del con

trol, así como las provenientes de los lavados de la columna de afinidad, se precipitaron con ATA a una concentración final de 10 %, se centrifugaron a 3 500 rpm; la pastilla resultante se re suspendió en agua y se le ajustó el pH entre 7 y 8 (volumen final de aproximadamente 0.5 ml). Se tomaron alícuotas de las proteínas así tratadas y se sometieron a electroforesis en una y dos dimensiones, así como a fluorografía.

14.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con DSS en una dimensión con gradiente de 7-15 % de acrilamida.

Para el análisis por electroforesis en una dimensión de las proteínas se emplearon las siguientes soluciones:

Solución de acrilamida/bisacrilamida en proporción de 30:0.8 % p/v.

Tris-HCl 0.75 M con DSS 0.2 % pH 8.8.

Tris-HCl 0.25 M con DSS 0.2 % pH 6.8.

TEMED 10 % v/v.

Persulfato de amonio 12.5 % (se recomienda que este reactivo se prepare cada vez que se va a usar).

El gel separador en gradiente de 7-15 % se preparó como se indica a continuación:

	Solución 7 %	Solución 15 %
Acril/Bis	2.6 ml	5.5 ml
Tris-HCl 0.75 M + DSS 2% pH 8.8	5.5 ml	5.5 ml
Agua desionizada	2.9 ml	—————
TEMED 10 %	0.1 ml	0.1 ml
Persulfato de amonio 12.5 %	0.1 ml	0.1 ml

Antes de añadir el TEMED y el persulfato de amonio se deae-

rean las soluciones y se colocan en los compartimentos de un formador de gradientes. La solución más concentrada en la salida. Se adicionan el TEMED y el persulfato de amonio a cada compartimento, se mezclan las soluciones, se permite que los vasos se comuniquen y se inicia la formación del gradiente. El menisco formado en la placa se rompe con una capa de agua.

El gel condensador se preparó como se indica a continuación:

	Volumen
Acril/Bis	1.66 ml
Tris-HCl 0.25M + DSS 2% pH 6.8	5.00 ml
Agua desionizada	3.30 ml
TEMED 10 %	0.10 ml
Persulfato de amonio 12.5 %	0.10 ml

El buffer de electrodos está compuesto por tris-HCl 9.09 g , glicina 43.2 g y DSS 1.5 g, pH 8.3 en un volumen final de 1.5 litros. Las muestras de proteínas contenidas en aproximadamente 0.1 ml se mezclaron con el buffer de la muestra (tris 0.01 M, glicerol 10 % v/v, DSS 0.1 % p/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 % v/v, azul de bromofenol 0.0125 %p/v). La mezcla se agitó y se hirvió durante 1 minuto después de lo cual se aplicó a la placa de electroforesis. La corrida se efectuó aplicando una corriente constante de 17 mA a temperatura constante con baño de agua corriente. Al finalizar la corrida (el colorante marcador aproximadamente 1 cm arriba del extremo inferior del gel), se sacaron los geles y se tiñeron con la siguiente solución: azul de coomassie R-250 0.05 % p/v con ácido acético 7 % y metanol al 30 %, durante una hora;

posteriormente se lavaron con una solución de ácido acético al 7 % y metanol al 30 % hasta que las bandas de proteína fueron visibles.

#### 15.- Electroforesis en geles en dos dimensiones.

Para aumentar la resolución en la separación de proteínas se adaptó el análisis por electroforesis en dos dimensiones reportado por O' Farrell (94) y que consiste en lo siguiente: las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico por electroenfoque en la primera dimensión y de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en geles con DSS en la segunda dimensión.

Para el electroenfoque en tubo se emplearon las siguientes soluciones:

Buffer A constituido por:

Urea 9.5 M

Anfolinas pH 3-10 al 2 % (p/v).

$\beta$ -mercaptoctanol al 5 % (p/v).

Nonidet P-40 al 2 % (p/v).

Solución B constituida por:

Acrilamida 28.38 % (p/v).

Bis-acrilamida 1.62 % (p/v).

Solución C: Es la solución del ánodo,  $H_3PO_4$  0.01 M.

Solución D: Es la solución del cátodo, NaOH 0.02 M.

Solución E constituida por:

Urea 6 M

Anfolinas pH 3-10 al 1 %.

Buffer F constituido por :

Tris-HCl 0.06 M pH=6.8

DSS al 2 %

$\beta$ -mercaptoetanol al 5 %

Glicerol al 10 %.

Las soluciones A y E se guardan congeladas. Los tubos de vidrio usados en la primera dimensión tenían 3 mm de diámetro y 13 cm de longitud, se lavaron con mezcla crómica antes de usarse, se enjuagaron con agua, alcohol y se secaron.

Para preparar 5 ml (7 tubos ) del gel de electroenfoque se mezclaron las siguientes soluciones según se indica a continuación:

Urea	2.75 g
Solución B	0.665 ml
Nonidet P-40	1.000 ml.
Anfolinas pH 3-10	0.250 ml

La mezcla anterior se agitó hasta que se disolvió la urea y se añadieron 20 microlitros de persulfato de amonio al 10 %, se deaeró la solución y se añadieron 20 microlitros de TEMED al 10 %. Con esta mezcla se llenaron los tubos, sellados en su parte inferior con parafilm, se dejó libre aproximadamente 1 cm del gel al extremo del tubo. El menisco formado se rompió añadiendo 10 microlitros de agua en la superficie del gel. Una vez que la mezcla ha gelificado se quitó el parafilm y los tubos se colocaron en el aparato de electroforesis. Con la solución C se llenó el recipiente del ánodo, se quitó el agua de la superficie del gel y se colo

caron las siguientes soluciones en capas: 10 microlitros del buffer A, 10 microlitros de la solución E el resto de los tubos se llenó con la solución del cátodo (solución D); con esta misma solución se llenó el recipiente del cátodo. Los electrodos se conectaron y se hizo una precorrida de los geles como se indica a continuación: 30 minutos a 200 V, 30 minutos a 300 V y 60 minutos a 400 V.

Después de la precorrida se quitó la solución de la cámara superior (cátodo), evitando el contacto con la superficie del gel. Se quitó el buffer A y la solución E y se lavó la parte superior del gel tres veces con 20 microlitros de agua cada vez. Se aplicó la muestra en un volumen de 20 microlitros del buffer A y se añadieron las siguientes soluciones en capas: 10 microlitros de solución E, solución del cátodo hasta llenar los tubos. El recipiente del cátodo se llenó con el resto de la solución D. Se conectaron los electrodos y se inició la corrida de los geles a 400 V durante 18 horas.

Al terminar la corrida se sacaron los geles de los tubos con la ayuda de una jeringa con agua y se colocaron en parafilm para facilitar su manipulación. Si se desea almacenar los geles se puede hacerlo en el buffer F a  $-20^{\circ}\text{C}$  después de dejarlos equilibrar por 20 minutos.

Para la segunda dimensión se colocó el gel en tubo (electroenfoque) sobre un gel en placa preparado según se indica en la sección 14. La parte de aplicación de la muestra en primera dimensión (parte superior del tubo) se colocó en la parte izquierda de

a placa.

16.- Detección de proteínas  $^{14}\text{C}$  en geles de poliacrilamida por fluorografía.

Los geles de poliacrilamida se colocan en un recipiente con DMSO, recuperando este último después de 30 minutos y sometiendo los geles a un tratamiento similar por 30 minutos más. Este proceso se realiza con el fin de absorber el agua que contiene el gel.

Posteriormente se transfiere el gel a una solución de PPO en DMSO al 27.5 % p/v durante tres horas, después de lo cual se pasan a un recipiente con agua desionizada por dos horas más; finalmente el gel se coloca sobre papel filtro y se deja secar una hora en el secador de geles con vacío.

Los pasos siguientes se deben efectuar en la oscuridad:

El gel seco se pone en contacto con una película, se protege de la luz y se guarda durante dos a tres semanas en el refrigerador a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se saca la película, se coloca en solución reveladora por un lapso de tres minutos, después de lo cual se enjuaga con agua y se transfiere a un recipiente con solución fijadora por tres minutos más; se enjuaga nuevamente con agua y se puede proceder al análisis de las manchas de proteínas marcadas con  $^{14}\text{C}$ .

## IV

## R E S U L T A D O S

Debido a la importancia que tiene el ligando en la técnica de cromatografía de afinidad, se puso especial cuidado en la síntesis y caracterización de los intermediarios y de los ligandos que se emplearían en la columna de cromatografía de afinidad en este trabajo.

Las reacciones efectuadas en la obtención del ligando se esquematizan en la fig. 10; el ácido 2,4-diclorofenoxiacético se hace reaccionar con cloruro de tionilo para formar el cloruro del ácido, este último a su vez reacciona con el complejo lisina-cobre en el cual los grupos alfa amino se encuentran complejando al cobre, en tanto que los epsilon amino se encuentran libres. El complejo 2,4-D-lisina-cobre obtenido en la reacción anterior se descompone al pasarle una corriente de ácido sulfhídrico en medio ácido produciendo el ligando 2,4-D-lisina y como subproducto sulfuro de cobre. La función del aminoácido lisina es servir como brazo espaciador entre la auxina sintética 2,4-D y la matriz de la columna de afinidad. El producto se purificó mediante recristalización de etanol-acetona con un rendimiento de 35 % y se caracterizó por punto de fusión y espectroscopía de I.R. y R.M.N. tal como se reportó anteriormente (87).

El acoplamiento se llevó a cabo poniendo a reaccionar el ligando con la Sefarosa activada con bromuro de cianógeno. La metodología seguida en estos pasos se describió anteriormente. Las reacciones propuestas en el acoplamiento se esquematizan en la

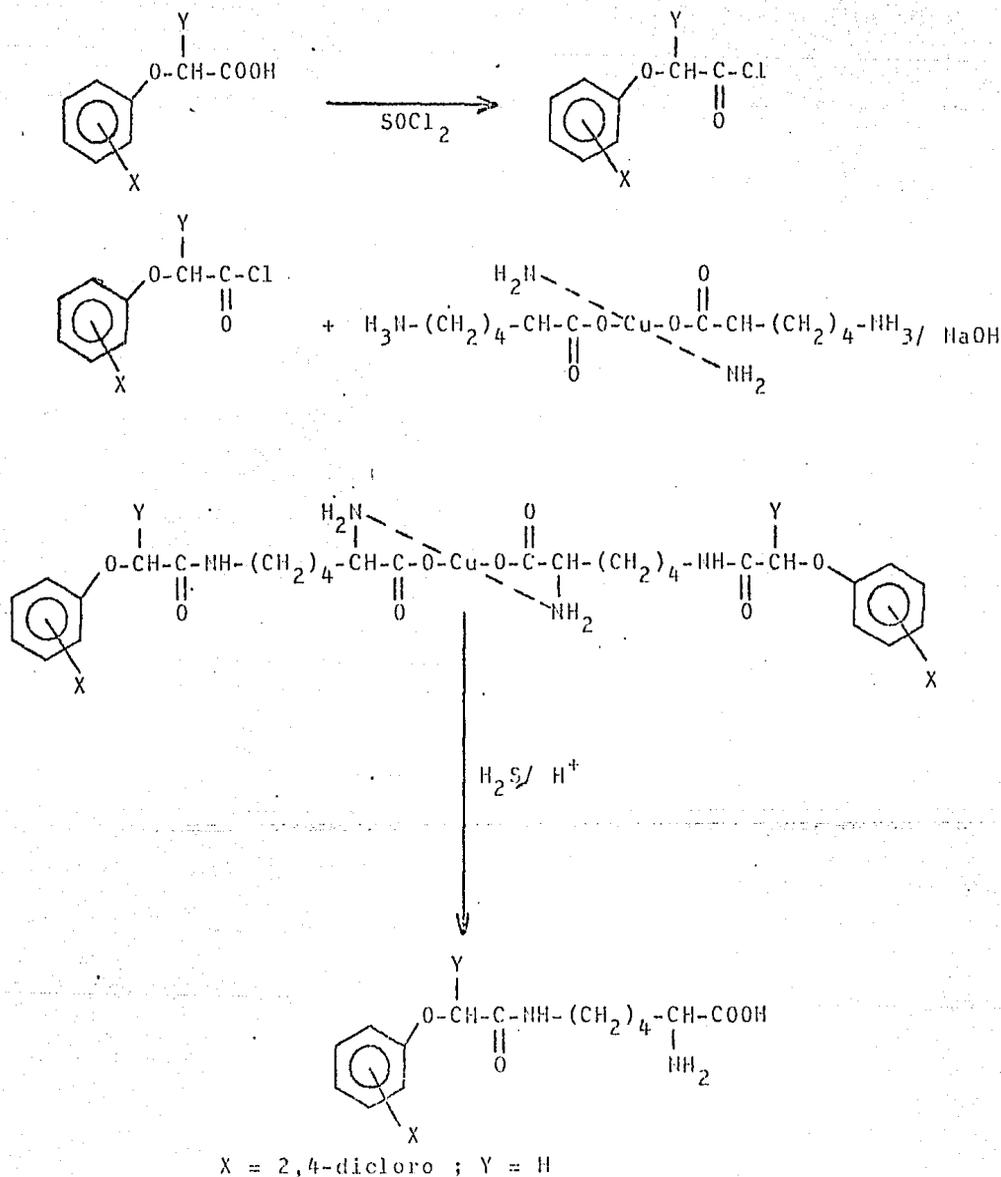


FIGURA 10 SINTESIS DEL LIGANDO 2,4-D-LISINA

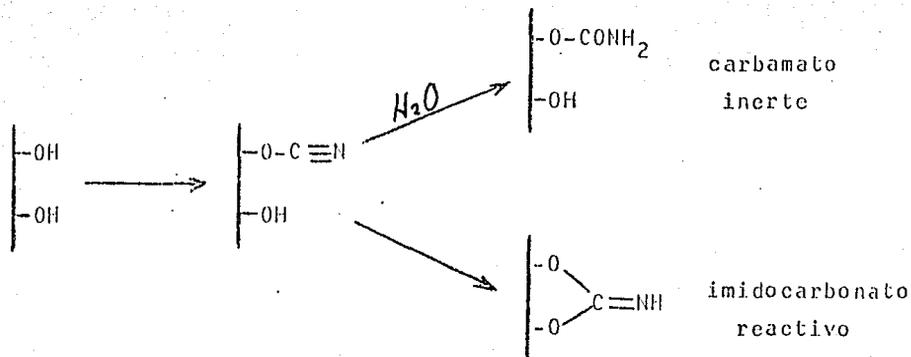
El ácido 2,4-diclorofenoxiacético reacciona con  $\text{SOCl}_2$  formando el cloruro del ácido correspondiente; este último reacciona con el complejo lisina-cobre y el producto se descompone con  $\text{H}_2\text{S}$  para obtener el ligando 2,4-D-lisina.

fig. 11. Para la activación de la Sefarosa con bromuro de cianógeno se ha sugerido la formación de dos productos: un carbamato inerte y un imidocarbonato que reacciona posteriormente con el ligando dando lugar a tres productos de la reacción de acoplamiento: un derivado de isourea que según algunos autores es el producto principal ( ), un imidocarbonato N sustituido y un carbamato N sustituido. El rendimiento de acoplamiento para la 2,4-D-lisina fue de aproximadamente 20 mg de ligando/ml de Sefarosa (tabla I). Este resultado es aproximadamente cuarenta veces mayor al rendimiento reportado anteriormente por Venis (40).

El decaimiento de la columna se siguió por un periodo de cincuenta y cuatro días, midiéndose la cantidad de ligando que permanecía acoplado después de almacenar la Sefarosa en una solución acuosa de azida de sodio al 0.02 % a 7°C. Los resultados de la tabla II demuestran que la columna de afinidad es estable durante los primeros veintisiete días después de sintetizada y al final de este periodo decaía rápidamente.

Debido a lo anterior se decidió buscar una reacción de acoplamiento que diera una unión más estable entre el ligando y el soporte y se eligió la técnica de activación por oxidación con peryodato de sodio (89). Las reacciones propuestas se esquematizan en la fig. 12. En esta técnica la Sefarosa se activa con peryodato de sodio y el aldehído resultante (VI) se hace reaccionar con el ligando formando la base de Schiff (VII) y la carbinolamina (VIII) correspondientes. Posteriormente se adiciona borohidruro de sodio para efectuar la reducción y obtener la amina (IX).

## ACTIVACION



## ACOPLAMIENTO

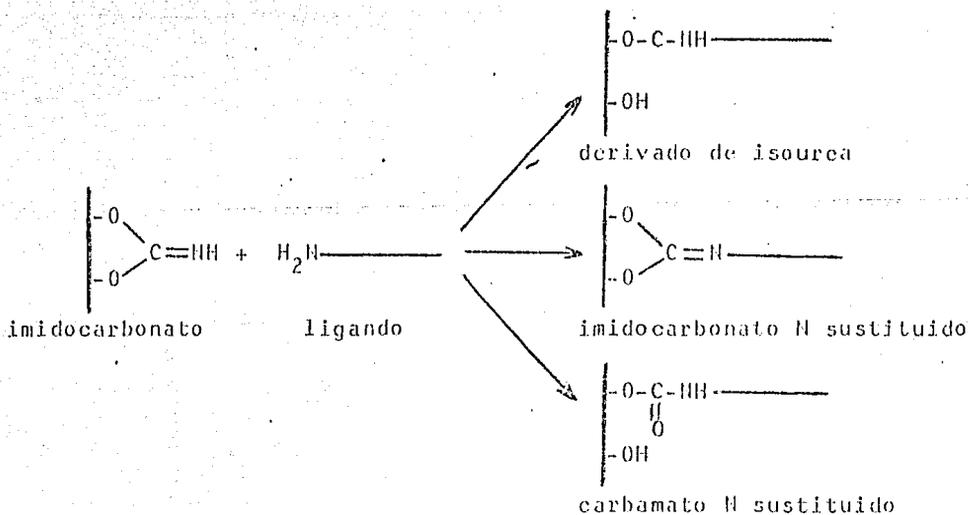


FIGURA 11 ACTIVACION DE LA MATRIZ Y ACOPLAMIENTO CON EL  
LIGANDO POR EL METODO DE BUCH

TABLA 1

## PREPARACION DE LAS COLUMNAS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Ligando	Método	mg Ligando/ml Sefarosa (c)	Rendimiento % (d)
2,4-D-Lisina	BrCH <sub>3</sub> (a)	20	30
2,4-D-Lisina	NaIO <sub>4</sub> (b)	3	6.7

(a) El ligando 2,4-D-lisina se hace reaccionar con la Sefarosa activada con bromuro de cianógeno. Se ha propuesto que la Sefarosa al reaccionar con el bromuro de cianógeno forma un imidocarbonato reactivo, al cual reacciona el ligando para producir derivados de isourea, imidocarbonatos sustituidos y carbamatos sustituidos, (Figura 11) (57).

(b) El ligando 2,4-D-lisina se hace reaccionar con la Sefarosa activada con oxidación de  $\text{NaIO}_4$ . Se propone que la Sefarosa al oxidarse con  $\text{NaIO}_4$  forma aldehídos que a su vez reaccionan con el ligando para dar carbinolamias y bases de Schiff, estas últimas al reducirse dan las aminos en posiciones (Figura 12).

(c) Los miligramos de ligando se calculan midiendo la absorbencia de la Sefarosa ocupada a  $260\text{m}\mu$  y conociendo el coeficiente de extinción molar del  $\text{NaIO}_4$  de 2,4-D-lisina y aplicando la ley de Beer (57).

(d) El rendimiento se obtiene considerando como 100% los mg de ligando que se pudiese acoplar y calculando el porcentaje que de esta cantidad representan los mg de ligando acoplado.

TABLA II

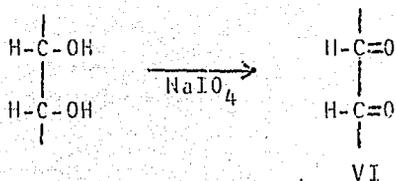
## ESTABILIDAD DE LA COLUMNA DE ACTIVIDAD CON 2,4-D-LISINA COMO LIGANDO

Tiempo (días)	mg ligando/ml Sefarosa (a)	Acoplamiento (b) %
0	20	100
11	19	95
27	16	80
36	12	60
45	5	25
54	5	25

(a) El ligando 2,4-D-lisina se acopla a la Sefarosa activada con Bromuro de cianógeno. Los miligramos de ligando acoplado se obtienen midiendo la absorbencia a 260 m $\mu$  (longitud de onda de máxima absorbencia del ligando), conociendo el coeficiente de extinción molar de 2,4-D-lisina y aplicando la ley de Beer.

(b) El 100 % de acoplamiento se tomó como la cantidad de ligando unido a la Sefarosa al término de la reacción de acoplamiento (tiempo cero).

ACTIVACION



ACOPLAMIENTO

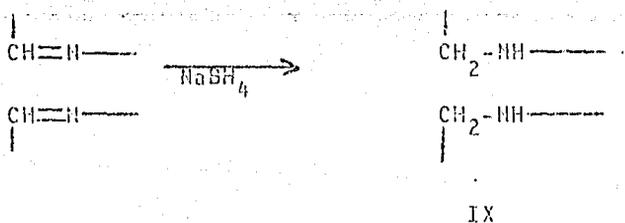
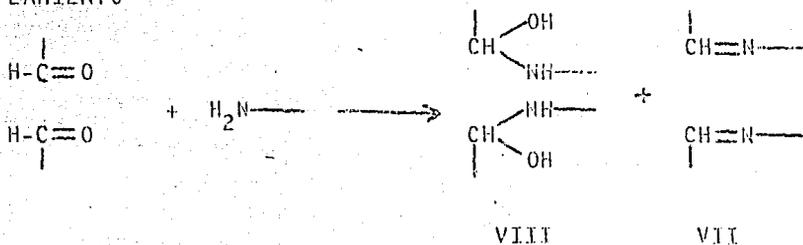


FIGURA 12 ACTIVACION DE LA MATRIZ Y ACOPLAMIENTO CON EL LIGANDO POR EL METODO DE NaIO<sub>4</sub>

La Sepharosa se activa con periodato de sodio y el aldedido resultante (VI) se hace reaccionar con el ligando; la base de 2-AMINO correspondiente (VII) se reduce con hidruro para dar la base (IX).

Los resultados indican que el rendimiento obtenido por este método es mucho menor (aproximadamente siete veces) al obtenido por el método de bromuro de cianógeno (tabla I). Esto concuerda con lo reportado en la literatura (89) de que los rendimientos obtenidos por este método son bajos para el caso de que se use Se farosa como soporte, Sin embargo, se encontró también que contra lo esperado, la columna decaía muy rápidamente perdiéndose todo el ligando acoplado a los siete días de realizada la síntesis. Esto puede deberse a que las carbinolaminas (VIII) no se redujeron en las condiciones experimentales usadas (96).

En base a lo anterior se decidió usar la columna de afinidad obtenida por el método de bromuro de cianógeno dentro de los vein te días posteriores a su síntesis.

Para probar la especificidad de esta columna se hizo pasar a través de ella el sobrenadante posribosomal de coleoptilos de maíz preparados según se indica en la sección de materiales y métodos. Se emplearon coleoptilos de maíz ya que sabe que éste es un tejido blanco en la respuesta de elongación a auxina y se ha reportado que ahí existe una proteína afín posible receptor de auxinas (84).

En la fig. 13 se muestra el patrón de las proteínas de maíz retenidas en la columna de afinidad, eluidas con un gradiente de 2,4-D de 0-50 mM, comparada con el patrón obtenido en condiciones similares para la albúmina de suero bovino. Se puede observar que la fracción de proteínas de coleoptilos que se retienen en la columna de cromatografía de afinidad es heterogénea; sin embargo ,

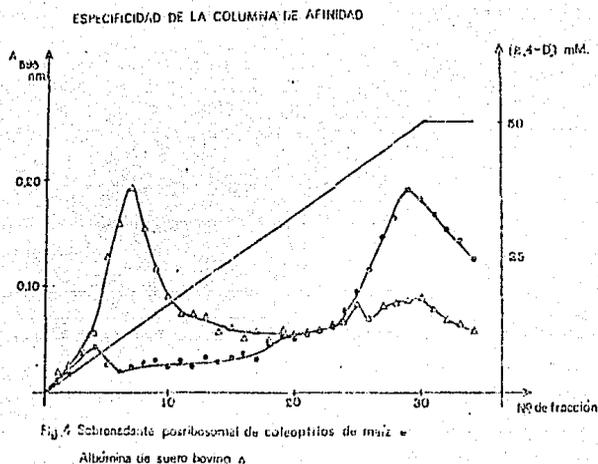


FIGURA 13 ESPECIFICIDAD DE LA COLUMNA DE AFINIDAD

En esta figura se muestra el patrón de elución de proteínas del sobrenadante posribosomal de coleóptilos de maíz eluidas con un gradiente de 2,4-D de 0-50 mM comparada con el patrón obtenido en condiciones similares en otra columna de afinidad para la albúmina de suero bovino. El patrón de coleóptilo se representa por círculos cerrados y el de albúmina por triángulos abiertos.

la fracción principal requiere de concentraciones elevadas de 2,4-D para ser eluida. (48 mM), muy por encima de la concentración requerida para la elución de la albúmina unida inespecíficamente, para la que se necesitan aproximadamente 12 mM de 2,4-D. Se pensó que la albúmina de suero bovino, una proteína no vegetal que se une inespecíficamente a auxinas podía ser un buen control de la capacidad que tenía la columna para separar proteínas con diferente afinidad a la auxina, ya que existe en la literatura un estudio de Murphy (97), según el cual la albúmina podría tomarse como un posible receptor auxínico si emplean los criterios de unión *in vitro* y determinación de  $K_D$  para dicha asignación. Por tanto los resultados obtenidos indican que efectivamente la columna es capaz de discriminar entre proteínas retenidas con distinta afinidad.

En un intento por caracterizar el receptor de auxinas del so brenadante postribosomal de ejes embrionarios de maíz, bajo los parámetros usuales, se efectuaron diversos experimentos para determinar la  $K_D$ . Para esto se siguieron los métodos descritos en la sección de materiales y métodos. En experimentos preliminares se obtuvieron los resultados que se muestran en la fig. 14 y que indican un valor de  $K_D$  del orden de  $5 \times 10^{-6} M$ , un valor que es del mismo orden de magnitud que los valores reportados en la literatura. Esta  $K_D$  se obtuvo a partir de los valores de la zona II de la curva de Scatchard. En la figura se observa que tiene una naturaleza bifásica a bajas concentraciones de 2,4-D (menores de 20 nM de 2,4-D unido, zonas I y II), la pendiente positiva de la

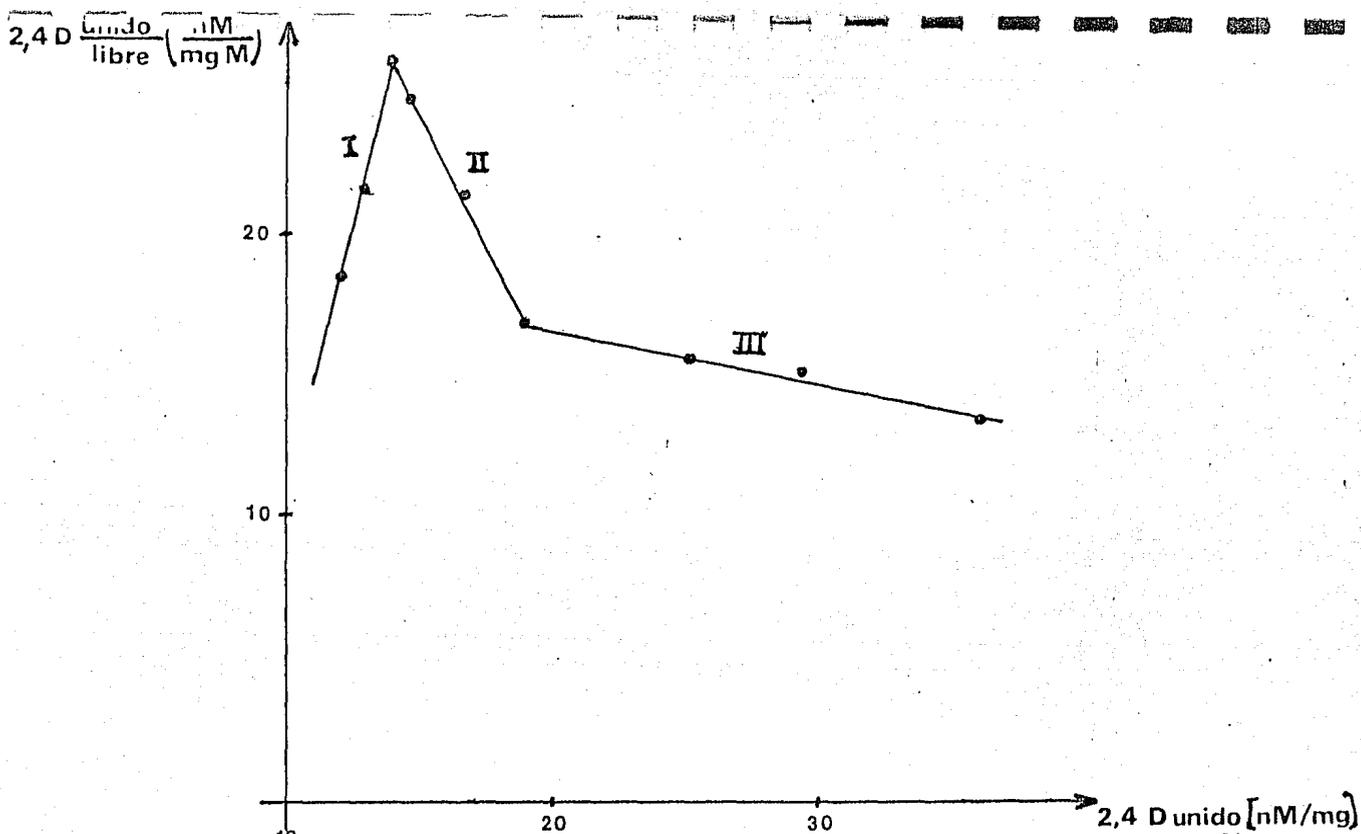


FIGURA 14 GRAFICA DE SCATCHARD PARA DETERMINAR LA  $K_D$  DEL COMPLEJO RECEPTOR SOLUBLE-2,4-D  $^{14}C$

Se tomó una alícuota del sobrenadante posribosomal de ejes embrionarios de maíz y se le adicionó 2,4-D  $^{14}C$  en concentraciones de 10-500 nM, se dejó equilibrar por 10 minutos, después de lo cual se saturó con  $(NH_4)_2SO_4$  a una concentración final de 75 %. Las proteínas precipitadas se filtraron en membranas, las cuales una vez secas se colocaron en un vial con líquido de Bray para determinar la radiactividad unida. Cada punto es resultado de una determinación

zona I se ha interpretado como indicadora de una cooperatividad positiva en la unión del 2,4-D al receptor, esta interpretación se basa en resultados similares con otras hormonas (78,79,99) . Sin embargo, este experimento no pudo ser reproducido en intentos posteriores ya que se obtuvieron resultados muy dispersos por lo que se decidió probar otros métodos para determinar la  $K_D$ , no obstante los resultados fueron negativos. Debido a lo anterior se trató de determinar el tiempo de vida media del complejo receptor-2,4-D  $^{14}C$  sin marca. El tiempo de vida media es un parámetro no reportado en la literatura y que está determinado por la velocidad de disociación de dicho complejo. Los resultados se muestran en la fig. 15 e indican que el tiempo de vida media es de 4.6 minutos.

Una vez efectuada la prueba de especificidad de la columna, se decidió estudiar las proteínas del sobrenadante postribosomal de ejes embrionarios de maíz que eran retenidas en la columna de afinidad. Se eligió este órgano ya que es uno de los que mejor responde a auxinas en el proceso de desdiferenciación para la formación de callos y se esperaba encontrar en él un receptor auxínico si es que las auxinas participan directamente en este proceso. Para ello se pusieron a imbibir los ejes embrionarios de maíz en un buffer con mezcla de aminoácidos marcados con  $^{14}C$ . Se aisló el sobrenadante postribosomal, el cual se pasó a través de columnas de afinidad. Las proteínas retenidas se eluyeron con gradientes de 0-50 mM de los siguientes compuestos con actividad auxínica: AIA (la auxina natural) y los análogos sintéticos 2,4-D

## DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA

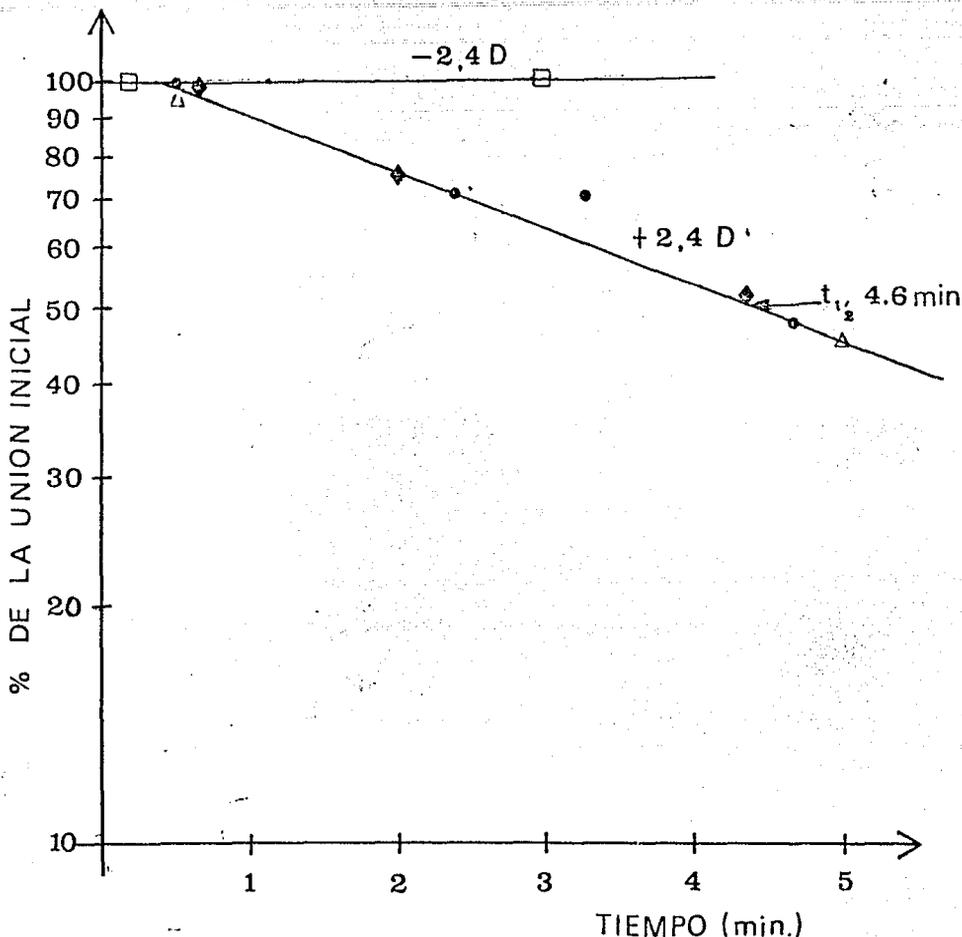


FIGURA 15 DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL COMPLEJO RECEPTOR SOLUBLE 2,4-D <sup>14</sup>C.

Se tomó una muestra del sobrenadante posribosomal de ejes embrionarios de maíz y se le adicionó 2,4-D <sup>14</sup>C en una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^{-6} M$ , se dejó equilibrar por aproximadamente 2 horas y se dividió en dos fracciones, a una de las cuales se le añadió 2,4-D sin marca quinientas veces más concentrado y a la otra se le dejó como control (tiempo cero). A los intervalos de tiempo indicados se tomaron alícuotas de ambas fracciones; se pasaron por discos de papel filtro DE81 se dejaron en contacto un minuto, se secaron y se determinó la radiactividad unida. La radiactividad del control se tomó como 100%. Los puntos representados por rombos, círculos y triángulos son de experimentos distintos.

ANA y MCPP (este último sintetizado para este propósito). Los resultados indican que los ejes embrionarios de maíz, efectivamente poseen proteínas de unión específica a auxinas. Los patrones de elución se muestran en las figuras 16-19. Como se puede observar el patrón de elución fue similar tanto para la auxina nativa como para los análogos sintéticos, encontrándose principalmente dos picos, uno de baja afinidad llamado pico I y otro de mayor afinidad denominado pico II.

Sin embargo, la concentración de cada análogo requerida para eluir cada pico fue diferente según se indica en la tabla III. Como puede observarse el pico I presenta mayor afinidad por el AIA que por las auxinas sintéticas; sin embargo, éstas no muestran grandes diferencias entre sí para la elución de este pico. Estos resultados nos sugieren que en esta fracción se encuentran proteínas involucradas directamente en el metabolismo de AIA. En el pico II se observan mayores diferencias respecto a las concentraciones requeridas para las distintas auxinas probadas. Las proteínas de esta fracción requieren de menor concentración de MCPP que de la auxina natural para ser eluidas (tabla III), en tanto que para los otros análogos 2,4-D y ANA se requieren concentraciones respectivamente mayores. Este orden de elución está directamente correlacionado con la capacidad que tienen estos compuestos para inducir y mantener callos de maíz (4,5) y pudiera ser un indicador de la diferente afinidad de estas proteínas por dichos análogos.

Las proteínas retenidas en la columna de afinidad se sometie

## PATRON DE ELUCION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD CON 2,4-D COMO ELUYENTE

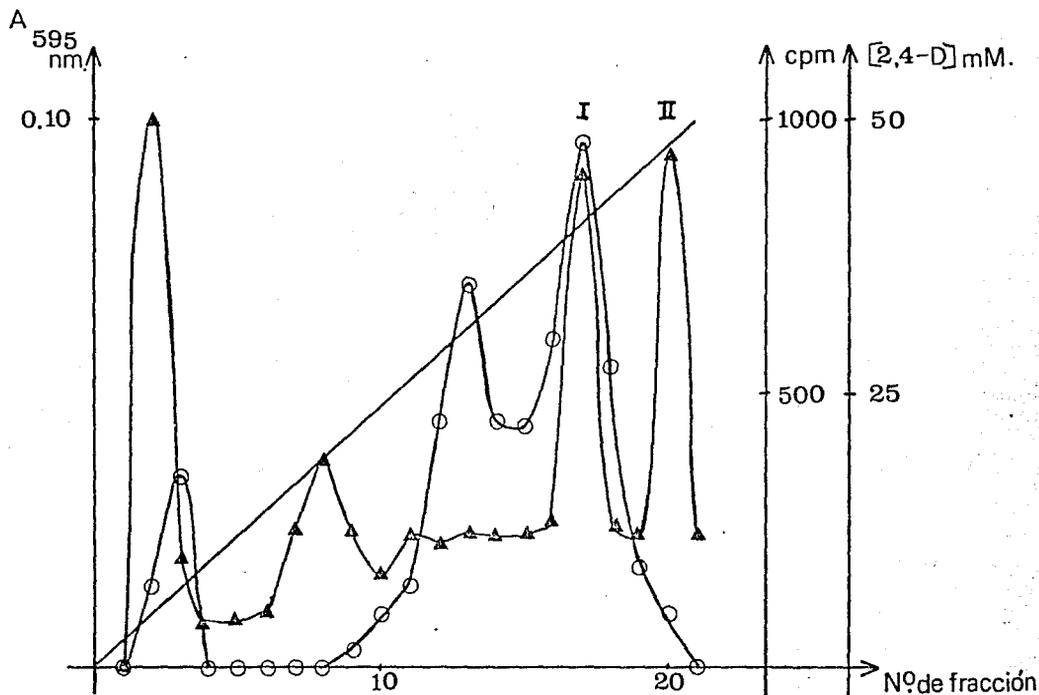


Fig 6 Proteína O , Radiactividad en cpm. ▲

FIGURA 16 PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEÍNAS POSRIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ RETENIDAS EN LA COLUMNA DE AFINIDAD Y ELUIDAS CON 2,4-D.

Los ejes embrionarios de maíz se pusieron a imbibir en presencia de mezcla de aminoácidos  $^{14}\text{C}$  después de lo cual se obtuvo el sobrenadante posribosomal, el cual se puso en contacto con la columna de afinidad. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente de 0-50 mM de 2,4-D. Las fracciones que contenían los picos de proteínas se precipitaron con ATA, se resuspendieron y se sometieron a análisis en electroforesis.

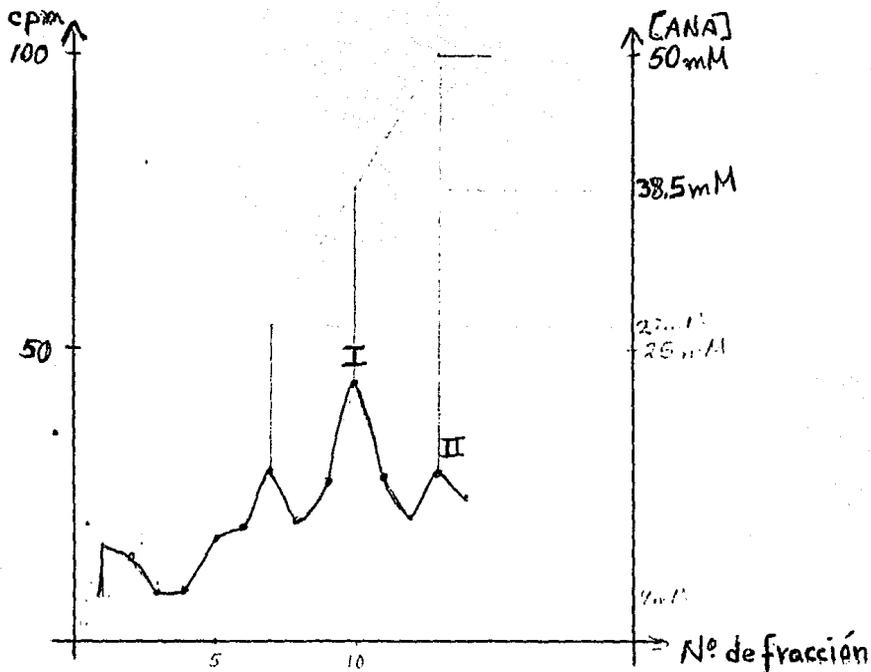


FIGURA 18 PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS POSRIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ RETENIDAS EN LA COLUMNA DE AFINIDAD Y ELUIDAS CON ANA.

Los ejes embrionarios de maíz se pusieron a imbibir en presencia de mezcla de aminoácidos  $^{14}\text{C}$ , después de lo cual se obtuvo el sobrenadante posribosomal el cual se puso en contacto con la columna de afinidad. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente de 0-50 mM de ANA. Las fracciones que contenían los picos de proteínas se precipitaron con ATA, se resuspendieron y se sometieron a análisis en electroforesis.

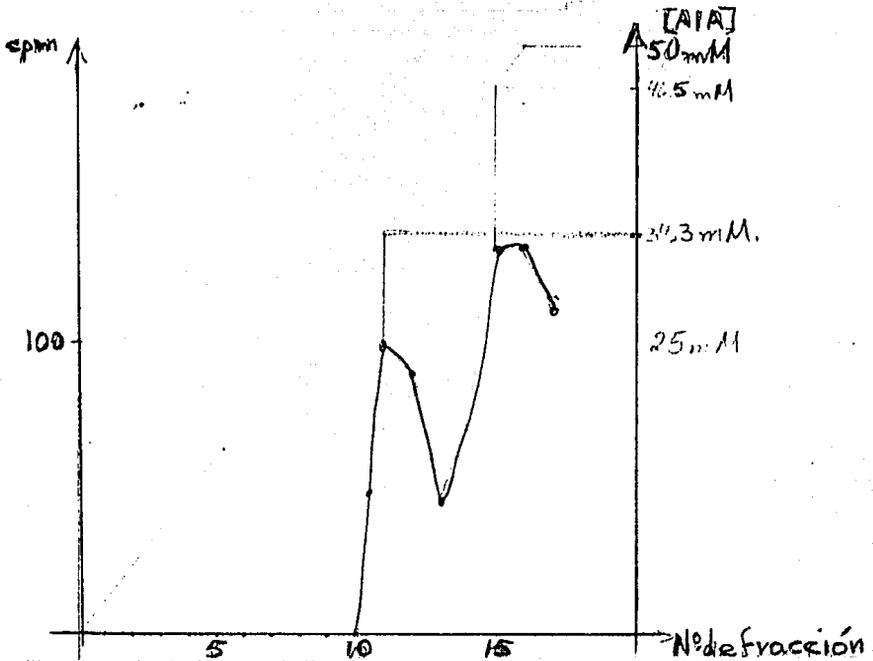


FIGURA 19 PATRON DE ELUCION DE LAS PROTEINAS POSRIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ RETENIDAS EN LA COLUMNA DE AFINIDAD Y ELUIDAS CON AIA.

Los ejes embrionarios de maíz se pusieron a imbibir en presencia de mezcla de aminoácidos  $^{14}\text{C}$  después de lo cual se obtuvo el sobrenadante posribosomal el cual se puso en contacto con la columna de afinidad. Las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente de 0-50 mM de AIA. Las fracciones que contenían los picos de proteínas se precipitaron con ATA, se resuspendieron y se sometieron a análisis en electroforesis.

TABLA III

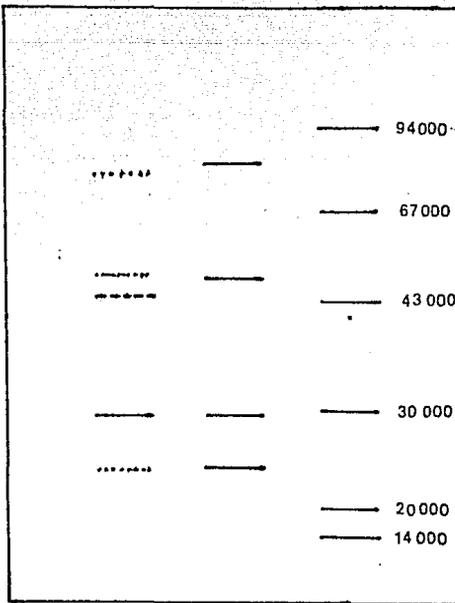
CONCENTRACIONES DE AUXINAS REQUERIDAS PARA ELUIR LAS PROTEINAS DEL SOBRENADANTE POSRIBOSOMAL DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ RETENIDAS EN LA COLUMNA DE AFINIDAD.

	ELUYENTES			
	AIA	2,4-D	MCPP	ANA
PICO I	34.3 mM	39.0 mM	38.5 mM	38.5 mM
PICO II	46.5 mM	48.0 mM	45.5 mM	50.0 mM

Las concentraciones de las distintas auxinas requeridas para eluir las proteínas de los picos I y II de los ejes embrionarios de maíz se indican en esta tabla (figuras 16-19).

ron a un análisis electroforético en geles de poliacrilamida en gradiente de 7-15 % con DSS y se obtuvieron sus fluorografías . Los resultados se muestran en los esquemas de las figuras 20 y 21 y corresponden a los picos de elución con 2,4-D y MCPP respectivamente. Como puede observarse en estos patrones así como en las fluorografías correspondientes, las fracciones analizadas son heterogéneas. Basándose en proteínas estándar de peso molecular conocido, ver sección de materiales y métodos, se hizo la asignación del peso molecular de las bandas proteicas de los picos de elución. Se puede observar que entre las proteínas más abundantes retenidas en las columnas de afinidad se encuentran unas de 93 000, 89 000, 84 000, 63 000, 50 000, 38 900 y 24 000 daltones de peso molecular. Es necesario señalar que de las proteínas antes mencionadas la mayoría son comunes a los dos picos de elución, sin embargo, las de 84 000, 63 000, 50 000 y la de 24 000 daltones de peso molecular son características del pico de mayor afinidad (II). Sería de esperarse que entre las proteínas de mayor afinidad (pico II) se encontrara el receptor de auxinas así como las proteínas involucradas en el metabolismo de estos compuestos sintéticos. La caracterización de cada una de estas proteínas requiere de estudios adicionales.

Como ya se mencionó anteriormente, en estudios previos se ha demostrado que el MCPP así como otras auxinas sintéticas producen un fenómeno de desdiferenciación en tejidos de maíz en el que a partir de un tejido organizado producen callos. El eje embrionario de maíz es uno de los órganos que forman callos más



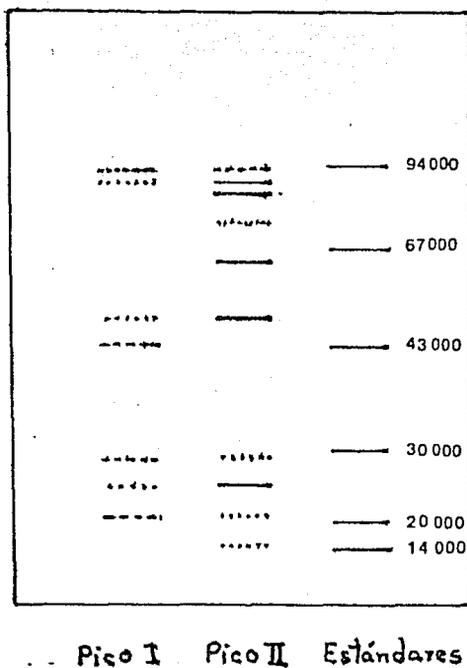
Pico I Pico II Estándares

AZUL DE COOMASSIE

FIG. 20

FIGURA 20 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS PICOS I Y II DE LA COLUMNA DE AFINIDAD ELUIDOS CON 2,4-D.

Las fracciones de la columna de afinidad que contenían los picos I y II se precipitaron con ATA, se resuspendieron y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de 7-15 %. El esquema señala el patrón de tinción de dichas proteínas con azul de Coomassie, así como el patrón de proteínas estándar de peso molecular conocido (No se anexan las fotografías debido a que la cantidad de proteína fue tan pequeña que no fue posible obtenerlas).



AZUL DE COOMASSIE

FIGURA 21 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS PICOS I Y II DE LA COLUMNA DE AFINIDAD ELUIDOS CON MCPP.

Las fracciones de la columna de afinidad que contenían los picos I y II se precipitaron con ATA, se resuspendieron y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de 7-15 %. El esquema señala el patrón de tinción de dichas proteínas con azul de Coomassie, así como el patrón de proteínas estándar de peso molecular conocido (No se anexan las fotografías debido a que la proteína no fue suficiente para obtenerlas)..

más eficientemente (4,5).

El mecanismo de acción molecular del MCPP en este proceso de desdiferenciación se esperaría que tuviera una estrecha relación con el efecto de auxinas sobre la transcripción y/o procesamiento de las moléculas transcritas, lo que se reflejaría en el patrón de proteínas sintetizadas. Sería de esperarse que en este proceso participaran alguna(s) de la(s) proteína(s) de alta afinidad por auxinas entre las que podría encontrarse el receptor. Por esto, se estudió el efecto del MCPP en la incorporación de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$  en las proteínas sintetizadas durante las primeras horas de la germinación en ejes embrionarios de maíz. Se encontró que esta auxina sintética provoca un aumento en la incorporación de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$  en las proteínas del sobrenadante postribosomal sin alterar las pozas de aminoácidos (tabla IV).

Buscando si esta diferencia en incorporación se debía a que aumentaba en general la cantidad de proteínas sintetizadas o bien si se debía a una alteración de ciertas proteínas específicas de entre el total, se hizo el análisis electroforético bidimensional de dichas proteínas, que se sintetizaron en presencia de MCPP y se compararon con las proteínas sintetizadas en ese mismo periodo en ausencia de la auxina. Los resultados se muestran en las figuras 22 y 23 y corresponden a las fluorografías de las proteínas control y de las proteínas sintetizadas en presencia de 5 mg/l de MCPP respectivamente. Como se puede observar, el MCPP produce cambios cuantitativos de algunas proteínas específicas,

TABLA IV

INCORPORACION DE AMINOACIDOS  $^{14}\text{C}$  EN LAS PROTEINAS SINTETIZADAS DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE IMBIBICION EN EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ .

Tratamiento	cpm/ mg de proteína
Control	151 585
+ 5 mg/l de HCPP	214 181

Nota: Con el fin de observar si la diferencia en incorporación se debía a que la poza de aminoácidos se hubiera alterado por el tratamiento con HCPP, se midieron éstas y resultaron similares por lo que la diferencia en incorporación si es significativa, aumentando un 41 %.



FIGURA 22 FLUOROGRAFIA DE LAS PROTEINAS DEL SOBRENADANTE POSRIBOSOMAL DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ SINTETIZADAS EN PRESENCIA DE HCPP.

Los ejes embrionarios de semillas de maíz se pusieron a imbibir durante 24 horas en presencia de 5 mg/l de HCPP. De las 18-24 horas se les dió un pulso con mezcla de aminoácidos. El sobrenadante posribosomal se analizó por electroforesis en dos dimensiones y se obtuvo la fluorografía correspondiente.

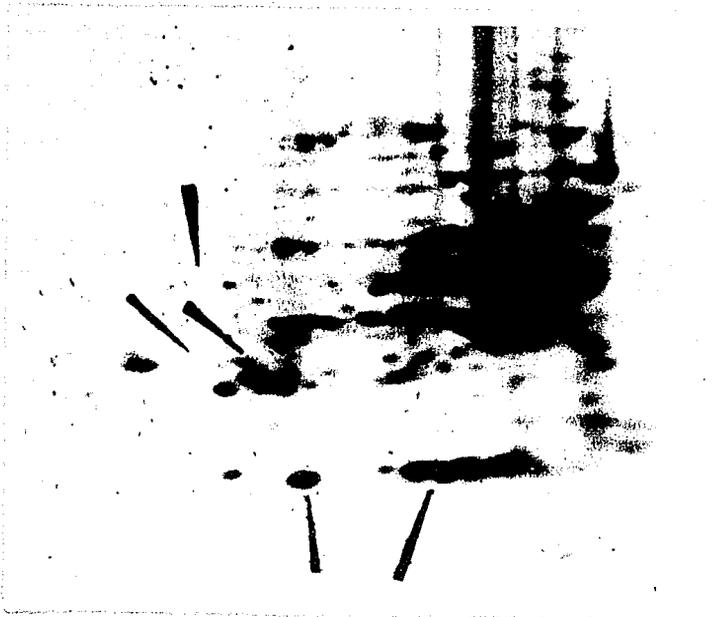


FIGURA 23 FLUOROGRAFIA DE LAS PROTEINAS DEL SOBRENADANTE POSRIBOSOMAL DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ (CONTROL).

Los ejes embrionarios de semillas de maíz se pusieron a imbibir durante 24 horas. De las 18-24 horas se les dió un pulso de amino ácidos  $^{14}\text{C}$ . El sobrenadante posribosomal se analizó mediante electroforesis en dos dimensiones y se obtuvo la fluorografía correspondiente.

algunas aumentan en relación al control, en contraste otras proteínas mostraron disminución de la marca e incluso se ha encontrado una inversión de la incorporación entre dos proteínas; estos cambios se indican en las fluorografías mediante flechas rojas. El MCPP produce también cambios cualitativos del patrón electroforético ya que se puede observar aparición de algunas proteínas y la desaparición de otras en relación al control; estos cambios se indican en las fluorografías por flechas azules.

En base a los resultados anteriores y tratando de saber más acerca de las proteínas del sobrenadante postribosomal alteradas por esta auxina sintética se decidió estudiar la afinidad de estas proteínas por el ligando de la columna de cromatografía de afinidad. Para ello se reprodujeron los experimentos anteriores y el sobrenadante postribosomal con las proteínas marcadas se pasó por la columna de afinidad. En la figura 24 se muestra el análisis electroforético bidimensional de las proteínas que no se retuvieron en la columna de afinidad y en la fig. 25 se muestra la fluorografía correspondiente al análisis electroforético en una dimensión de las proteínas retenidas en la columna de afinidad y eluidas de la misma mediante lavados sucesivos con concentraciones crecientes de 2,4-D (15, 30 y 50 mM). El análisis de dichos resultados indica que algunas de las proteínas alteradas por el tratamiento con MCPP tienen alta afinidad por las auxinas sintéticas y corresponde a las analizadas previamente en la columna de afinidad, tal como se indica en las figuras 22-24 por las flechas verdes.

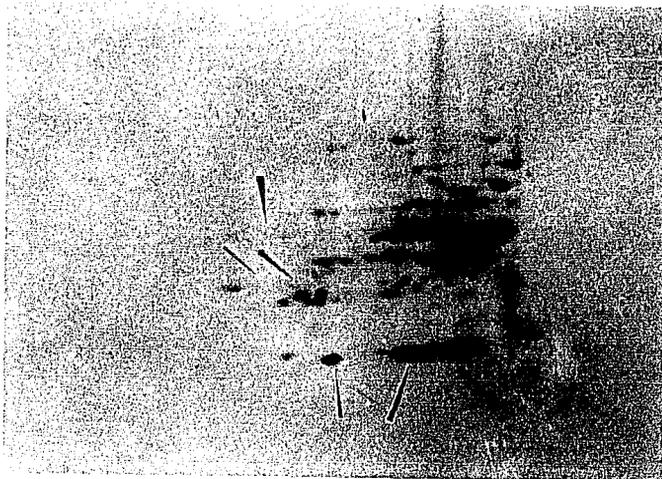


FIGURA 24 FLUOROGRAFIA DE LAS PROTEINAS DEL CONTROL QUE NO SE RETUVIERON EN LA COLUMNA DE AFINIDAD.

Los ejes embrionarios de semillas de maíz se pusieron a imbibir durante 24 horas. De las 18-24 horas se les dió un pulso de aminoácidos  $^{14}\text{C}$ . El sobrenadante posribosomal se pasó a través de una columna de afinidad. Las proteínas que no se retuvieron se analizaron mediante electroforesis en dos dimensiones y se obtuvo su fluorografía.

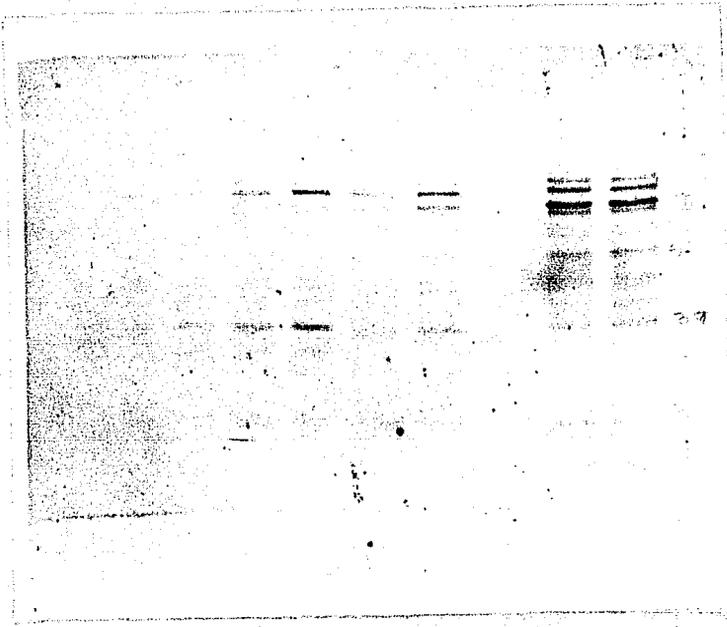


FIGURA 25 FLUOROGRAFIA DEL ANALISIS ELECTROFORETICO EN UNA DIMENSION DE LAS PROTEINAS RETENIDAS EN LA COLUMNA DE AFINIDAD.

Los ejes embrionarios de semillas de maíz se pusieron a inhibir durante 24 horas. De las 18-24 horas se les dió un pulso con mezcla de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$ . El sobrenadante posribosomal se pasó a través de una columna de afinidad con 2,4-D-lisina como ligando. Las proteínas retenidas se eluyeron de la columna mediante lavados sucesivos con concentraciones crecientes de 2,4-D (15, 30 y 50 mM). Las proteínas de los lavados se precipitaron con ATA, se resuspendieron y se analizaron por electroforesis en gradientes de poliacrilamida 7-15 % y se obtuvo su fluorografía.

## V

## DISCUSION

Como ya se mencionó anteriormente la mayoría de los investigadores que han realizado estudios tendientes a establecer el mecanismo de acción de auxinas lo han hecho en tejidos que responden con elongación a estos fitorreguladores (6, 52, 53). Asimismo se ha propuesto que las auxinas al igual que otros fitorreguladores ejercen su acción fisiológica mediante la interacción inicial con receptores celulares específicos. La aproximación metodológica más usada incluye estudios de unión *in vitro* y requiere que el posible receptor presente características de especificidad de unión y afinidad consistentes con la actividad de la auxina probada *in vivo* (52,53). Sin embargo existen un gran número de limitaciones metodológicas tales como la estabilidad del posible receptor contra la acción de proteasas, su estabilidad y actividad a distintos pH's y temperaturas, su baja afinidad por el ligando, etc; por lo que por lo general las  $K_D$ 's para estos fitorreguladores son mayores que para las hormonas animales. Esto ha hecho que los grupos de investigadores involucrados en este problema no hayan avanzado en la elaboración de un modelo para explicar el mecanismo de acción de las auxinas.

La relevancia del presente trabajo es que ofrece otra manera de abordar el estudio del mecanismo de acción auxínica, abriendo un gran número de posibilidades susceptibles de ser probadas en el laboratorio. Esta nueva aproximación se basa en el análisis

a nivel molecular del efecto de estos fitoreguladores en embriones de maíz, tratando de caracterizar e identificar las proteínas involucradas en la acción de auxinas. Este órgano responde a las auxinas desdiferenciándose (alterando el patrón de proteínas sintetizadas) y no mediante la respuesta clásica de elongación celular. De esta manera este órgano nos ofrece un muy buen modelo de estudio en el que la respuesta predominante es la regulación de la expresión genética por auxinas.

La primera aproximación al problema siguió los lineamientos clásicos de identificar al posible receptor de auxinas en base a sus características de unión a auxinas *in vitro*. En experimentos preliminares se obtuvo una  $K_D$  con un valor aproximado de  $5 \times 10^{-6} M$ . Este orden de afinidad es similar al determinado en estudios anteriores de receptores auxínicos (52,53). Asimismo la gráfica de Scatchard sugiere que a bajas concentraciones de auxinas la proteína receptora experimenta una cooperatividad positiva en su unión a la auxina. Sin embargo esta gráfica no se pudo reproducir en experimentos posteriores debido a que los resultados presentaron una gran dispersión por la baja radiactividad específica del 2,4-D disponible. Una explicación de este hecho reside en que el valor del tiempo de vida media del complejo receptor-2,4-D  $^{14}C$  determinado por su velocidad de disociación fig. 15 es muy pequeño. Este parámetro no está reportado en la literatura y nos indica que para disminuir la unión inespecífica por lavados (la unión inespecífica contribuye a la variabilidad de los resultados), se requiere que el tiempo en que el complejo se

encuentre bajo condiciones de no equilibrio no rebase 15 % del valor del tiempo de vida media, para evitar que se pierda más del 10 % del ligando unido específicamente (52). Bajo las condiciones experimentales usadas (aumento de quinientas veces del 2,4-D sin marca respecto a la concentración de 2,4-D  $^{14}\text{C}$ , para eliminar la unión inespecífica) se obtiene un tiempo de vida media de 4.6 minutos; dichas condiciones se usaron también en la determinación de la  $K_D$ . Este resultado indica que el tiempo para trabajar en condiciones de no equilibrio en la determinación de la  $K_D$  debería ser de 41 segundos y las facilidades técnicas disponibles hacen muy difícil trabajar bajo estas condiciones. Como se puede observar esta manera de abordar el problema presenta muchas limitaciones y no permite avanzar más allá de lo que se ha logrado a la fecha.

Otra aproximación en el estudio del mecanismo de acción de las auxinas que pudiera dar mejores resultados es el análisis de las proteínas alteradas por dichos fitorreguladores.

En estudios efectuados anteriormente en nuestro laboratorio, en los que se trataba de optimizar el medio para inducir callos de maíz, empleando las auxinas sintéticas 2,4-D y MCPP a distintas concentraciones (2, 6, 10 y 20 mg/l), se encontró que los embriones eran la mejor fuente y que el MCPP es más eficiente que el 2,4-D en todas las concentraciones probadas, siendo la concentración óptima para el MCPP de 6 mg/l. A concentraciones mayores y menores de esta auxina sintética la respuesta disminuye (4).

En base a lo anterior en este trabajo se estudió el efecto

del MCPP en las proteínas sintetizadas en ejes embrionarios de maíz, por lo que se agregó esta auxina en el medio de incubación. La concentración de MCPP empleada fue de 5 mg/l, muy cercana al óptimo obtenido en la inducción en los estudios anteriores. El tiempo en que se estudió la respuesta fue de las 18-24 horas de imbibición. Se eligió este lapso de tiempo ya que en experimentos anteriores efectuados en nuestro laboratorio se había encontrado que la transcripción de  $ARN_m$  *de novo* es importante a partir de este periodo (98). Si se propone que las auxinas regulan la transcripción y/o traducción, éste sería un periodo adecuado. Por otra parte también en experimentos efectuados anteriormente se observó que al aplicar pulsos de MCPP a embriones de maíz a distintos periodos de tiempo, depletándolos después de la auxina, la inducción de callos se volvía irreversible en este periodo (100). De esta manera este lapso de tiempo en que se estudia el efecto del MCPP nos permite observar los efectos bioquímicos primarios antes de que se manifiesten los cambios fisiológicos, para los cuales es necesario dejar transcurrir más tiempo.

Los resultados obtenidos indican que el MCPP aumenta la incorporación de aminoácidos marcados con  $^{14}C$  en las proteínas recién sintetizadas (tabla IV). Para explicar este incremento en la incorporación de aminoácidos existen varias posibilidades: que haya aumentado la síntesis total de las mismas proteínas para las que había los  $ARN_m$  correspondientes, o bien que haya ha-

bido un cambio en el patrón de las proteínas sintetizadas (cambio cualitativo). Tratando de dilucidar entre ambas posibilidades se hizo un análisis electroforético de las proteínas sintetizadas y se encontró que el MCPP produce cambios cuantitativos así como cualitativos. Estos cambios pueden deberse a una estimulación selectiva en la traducción de ciertos  $ARN_m$ , existen evidencias en la literatura que apoyan esta posibilidad(

Otra posibilidad sería que se estimule la transcripción selectiva de ciertos  $ARN_m$ , de lo cual también existen ciertas evidencias (34, 35, 44); sin embargo resulta difícil de explicar todos los cambios observados en los patrones electroforéticos por estos mecanismos y queda aún la posibilidad de que la auxina provoque además la modificación post traduccional de ciertas proteínas modificando su carga y por tanto su localización en los geles de electroforésis, lo que explicaría que unas manchas desaparecieran y otras aparecieran en el fluorograma bidimensional. Al respecto resultados preliminares en nuestro laboratorio sugieren que el MCPP influye en la fosforilación de algunas de las proteínas sintetizadas durante las primeras horas de la germinación en maíz (100). En este sentido se podría plantear un mecanismo de acción en cascada en el que alguno de los  $ARN_m$  modificado por la auxina codifique para alguna cinasa que fosforilaría otras proteínas desatando así una serie de cambios sucesivos ( ).

Con el fin de saber un poco más acerca de las proteínas sintetizadas en ejes embrionarios de maíz durante las primeras

horas de la germinación, se decidió preparar columnas de cromatografía de afinidad que tuvieran 2,4-D-lisina como ligando, ya que se esperaba que el posible receptor tuviera una alta afinidad por este ligando y de esta manera quedara retenido en la columna. Las proteínas retenidas en la columna de afinidad se eluyeron con gradientes de auxina de 0 - 50 mM (como eluyentes se emplearon la auxina natural AIA y las auxinas sintéticas ANA, 2,4-D y MCPP). Se observó que entre las proteínas retenidas se encontraban algunas de las que se habían visto alteradas por el MCPP (figuras 27-29). La fracción de proteínas retenidas con mayor afinidad a la columna, es decir aquellas que requieren de mayor concentración de auxina para eluirse, resultó ser heterogénea. Lo anterior puede explicarse si se considera que dentro de esta fracción podrían encontrarse tanto el posible receptor auxínico como las proteínas involucradas en el metabolismo de las auxinas. Por otra parte resulta muy interesante que la cantidad de algunas de estas proteínas estén reguladas por esta auxina. Así pudiera ser que la auxina estimule la síntesis de dichas proteínas o bien que inhiba su degradación porque las estabilice al unirse con ellas o bien que modifique su compartimentalización. Por otra parte el orden de afinidad, determinado como la concentración de auxina necesaria para eluir las proteínas retenidas en la columna de afinidad, correlaciona con la actividad de estos compuestos en la inducción y mantenimiento de callos de maíz, lo cual apoya el papel de estas proteínas en la inducción de callos de maíz.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo

se perciben nuevas posibilidades para abordar el estudio del mecanismo de acción auxínico. Por una parte es necesario establecer el o los niveles de regulación de la expresión genética en el modelo estudiado. Por otra parte se debe intentar identificar las proteínas retenidas con mayor afinidad en la columna. Si como ya se mencionó se propone que entre estas proteínas se encuentra el receptor así como las proteínas involucradas en el metabolismo de las auxinas deberían separarse y caracterizarse midiendo las actividades enzimáticas respectivas, ya reportadas en la literatura. De esta manera se podría ir discriminando entre los posibles candidatos a receptor auxínico.

### Conclusiones:

1) Se encontró en el sobrenadante posribosomal de ejes embrionarios de maíz una fracción proteica con alta afinidad por la auxina sintética 2,4-D, que dió en estudios preliminares un valor aproximado de  $K_D$  de  $5 \times 10^{-6}$  M y que tiene una velocidad de disociación muy rápida. Además se sugiere de acuerdo a los estudios preliminares de  $K_D$  (gráfica de Scatchard), que la fracción proteica interacciona con el 2,4-D  $^{14}C$  mediante una cooperatividad positiva.

2) El MCPP produce un incremento en la incorporación de marca en las proteínas sintetizadas durante las primeras horas de la germinación. El incremento se debe tanto a alteraciones cuantitativas como cualitativas de las proteínas sintetizadas. Entre las proteínas alteradas se encuentran algunas que tienen alta afinidad por las auxinas. Se sugiere que entre ellas se encuentra el receptor auxínico, así como las proteínas involucradas en el metabolismo de auxinas.

## VI

## B I B L I O G R A F I A

1. Stoddart, J.L. y Venis, M.A., 5. Molecular and subcellular aspects of hormone action. Zeroni, N. y Hall, M.A., 6. Molecular effects of hormone treatment on tissue. En *Hormonal Regulation of Development. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Volume 9* Mac Millan, J. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 445-568 (1980).
2. Street, H.E. ed. *Plant Tissue and Cell Culture. Botanical Monographs Vol. II* Blackwell Scientific Publications, Oxford (1973).
3. Yamada, Y., Chap. I.1 Tissue Culture Studies on Cereals. Narayanawamy, S., I.10 Regeneration of Plants from Tissue Cultures. En *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Reinert, J. y Bajaj, Y.P.S. eds. Springer-Verlag N.Y. pp. 144-159 y 179-206 (1977).
4. Sánchez de Jiménez, E. y Albores, M. Auxinas sintéticas en la inducción de callos de maíz. *Agrociencia* No. 37, 151-160 (1979).
5. Sánchez de Jiménez, E., Albores, M. y Loyola, V.M. Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98, 347-353 (1981).
6. Moore, T.C. Chap. 1 Introduction; Chap. 2 Auxins. En *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 1-89 (1979).

7. Schneider, E. y Wightman, F. Chap. 2 Auxins. En *Phytohormones and Related Compounds*. Letham, Goodwin y Higgins eds. Elsevier/North Holland Biomedical Press pp. 29-105 (1978).
8. Wilkins, M.B. ed. Introduction. En *Physiology of Plant Growth & Development*. Mc. Graw Hill London pp. 3-43 (1969).
9. Weaver, R.J. ed. Reguladores del crecimiento de las plantas en la Agricultura. Caps. 1, 3, 4 y 12. Trillas, México (1976).
10. Bandurski, R.S. Homeostatic control of concentrations of indole-3-acetic acid. En *Plant Growth Substances 1979*. Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances Madison, Wisconsin July 22-26 1979. Skoog, F. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 37-49 (1980).
11. Cohen, J.D. y Bandurski, R.S. Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 403-430 (1982).
12. Davidonis, G.H., Hamilton, R.H. y Mumma, R.O. Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soybean root callus. *Plant Physiol.* 66, 537-540 (1980).
13. Scheel, D. y Sandermann, H. Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in cell suspension cultures of soybean (*Glycine max. L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*). *Planta* 152, 253-258 (1981).
14. Goldsmith, M.H.M. The polar transport of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 439-478 (1977).
15. Raven, J.A. The possible role of membrane electrophoresis in the polar transport of IAA and other solutes in plant ti

ssues. *New Phytol.* 82, 285-291 (1979).

16. Katekar, C.F. y Geissler, A.E. Auxin transport inhibitors. *Plant Physiol.* 56, 645-646 (1975).
17. Sussman, M.R. y Goldsmith, M.H.M. Auxin uptake and action of N-1-Naphthylphthalamic acid in corn coleoptiles. *Planta* 150, 15-25 (1981).
18. Vanderhoef, L.N. Auxin regulated elongation. What's new in *Plant Physiol.* 12, No. 7 25-28 (1981).
19. Rayle, D.L. Auxin-induced hydrogen ion secretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta* 14, 63-73 (1973).
20. Cleland, R.E., Rayle, D.L. Auxin,  $H^+$ -excretion and cell elongation. *Bot. Mag. Tokyo Special Issue* 1, 125-139 (1978).
21. Jacobs, M. y Ray, P.H. Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea. *Plant Physiol.* 58, 203-209 (1976).
22. Cleland, R.E. Kinetics of hormone-induced  $H^+$  excretion. *Plant Physiol.* 58, 210-213 (1976).
23. Zurfluh, L.L. y Guilfoyle, T.J. Auxin induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl. *Proc. - Natl. Acad. Sci.* 77, 357-361 (1980).
24. Hanson, J.B. y Trewavas, A.J. Regulation of plant cell growth: The changing perspective. *New Phytol.* 90, 1-18 (1982).
25. Cleland, R.E. Rapid stimulation of  $K^+$ - $H^+$  exchange by a plant growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 333-338 (1976).

26. Lado, P., Rasi-Caldogno, F. y Colombo, R. Effect of cycloheximide on IAA or FC-induced cell enlargement in pea internode segment. *Plant Sci. Lett.* 9, 93-101 (1977).

27. Morikawa, H., Kitamura, S. y Senda, M. effect of auxin on changes in the oriented structure of wall polysaccharides in response to mechanical extension in oat coleoptile cell wall. *Plant & Cell Physiol.* 19, 1553-1556 (1978).

28. Sakurai, M., Nishitani, K. y Masuda, Y. Auxin-induced changes in the molecular weight of hemicellulosic polysaccharides of the *Avena* coleoptile cell wall. *Plant & Cell Physiol.* 20, 1349-1357 (1979).

29. Masuda, Y. Auxin-induced change in noncellulosic polysaccharides of cell walls of monocot coleoptiles and dicot stems. *En Plant Growth Substances 1979. Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances, Madison Wisconsin.* Skoog, F. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York pp.79-89 (1980).

30. Maclachlan, G.A. Cellulose metabolism and cell growth. *En Proceedings of Life Science. Plant Growth Regulation.* Pilet, ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 13-20 (1977).

31. Hein, A.N.J. Molecular basis of the auxin-regulated extension growth and role of dextranase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6608-6612 (1981).

32. Verma, D.P.S. Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulose from auxin treated pea epicotyls. *J. Biol. Chem.* 250, 1019-1026 (1975).

33. Jacob, W.P.
34. Jacobse, J.V. Regulation of ribonucleic acid metabolism by plant hormones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 537-564 (1977).
35. Jacobsen, J.V. y Higgins, T.J.V. Chap. 10 The influence of phytohormones on replication and transcription. Chap. 11 Post-transcriptional, Translational and Post-translational effect of plant hormones. En *Phytohormones and Related Compounds*. Letham, Goodwin and Higgins eds. Elsevier/North Holland Press pp. 515-621 (1978).
36. Matthyse, A.G. y Phillips, C. A protein intermediary in the interaction of a hormone with the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63, 897-903 (1969).
37. Mennes, A.M., Bouman, H., Van Der Burg, M.P. y Libbenga, K.R. RNA synthesis in isolated tobacco callus nuclei and the influence of the phytohormones. *Plant Sci. Lett.* 13, 329-339 (1978).
38. Mondal, R.K. y Biswas, B.B. RNA stimulated by indoleacetic acid *Nature New Biology* 240, 111 (1972).
39. Roy, P. y Biswas, B.B. A receptor protein for indoleacetic acid from plant chromatin and its role in transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 1597-1606 (1977).
40. Venis, M.A. Stimulation of RNA transcription from pea and corn DNA by protein retained on Sepharose coupled to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1824-1827 (1971).

41. Rizzo, P.J., Pedersen, K. y Cherry, J.H. Stimulation of transcription by a soluble factor isolated from soybean hypocotyl by 2,4-D affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.* 8, 205-211 (1977).

42. Cherry, J.H. Regulation of RNA polymerase activity by a plasma membrane factor. En *Mechanisms of regulation of plant - growth*. Bialeski, R.L., Ferguson, A.R., Cresswell, H.H. eds. *Bulletin 12 The Royal Society of New Zealand Wellington* pp. 751-757 (1974).

43. Chen, Y.H., Lin, Ch.Y., Chang, H., Guilfoyle, T.J. y Key, J.L. Isolation and properties of nuclei from control and auxin treated soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* 56, 78-82 (1975).

44. O'Brien, J., Jarvis, B.C., Cherry, J. y Hanson, J.B. Enhancement by 2,4-D of chromatin RNA polymerase in soybean hypocotyl tissue. *Biochem. Biophys. Acta* 169, 35-43 (1968).

45. Verma, D.P.S. Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulose from auxin treated pea epicotyls. *J. Biol. Chem* 250, 1019-1026 (1975).

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

47. Theologis, A. y Ray, P. Early auxins-regulated polyadenilated mRNA sequences in pea stem tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 418-421 (1982).

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

49. Zurfluh, L.L. y Guilfoyle, T.J. Auxin and ethylene-induced changes in the population of translatable messenger RNA in basal sections and intact soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* 69, 338-340 (1982).
50. Yu, Y.B., Adams, D.O. y Yang S.F. Regulation of auxin-induced ethylene production in mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 589-590 (1979).
51. Jones, J.H., Kende, H. Auxin-induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* 146, 649-656 (1979).
52. Rubery, P.H. Auxin Receptors. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 569-596 (1981).
53. Kende, H. y Gardner, G., Hormone binding in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 267-290 (1976).
54. Ray, P.M. Auxin binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 59, 594-599 (1977).
55. Ray, P.M. & Dohrman, U. Characterization of Naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue. *Plant Physiol.* 59, 357-364 (1977).
56. Venis, M.A. & Batt, S. Membrane bound receptors for plant hormones. *Biochemical Society Transactions* Vol. 3, 1148-1151 (1975).
57. Venis, M.A. II Hormones-membranes. 4. Membrane-bound auxin receptors: Solubilization and characterization. *En Plant Growth Regulation. Proceedings of the 9th International Conference*

- on Plant Growth Substances, Lausanne, August 30-September 4, 1976, Pilet, P.E. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York, pp.27-34 (1977).
58. Venis, M.A. Receptors for Plant Growth Regulators. En Advances in Pesticide Science Part 3 Geissbühler, H. ed. Pergamon Press. Oxford pp. 487-493 (1979).
  59. Venis, M.A. Purification and properties on membrane-bound auxin receptors in corn. En Plant Growth Substances. Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances. Madison Wisconsin. Skoog, F. ed. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York pp.61-70 (1979).
  60. Ray, P.M., Dohrmann, U. y Hertel, R. Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. Plant Physiol. 60, 585-591(1977).
  61. Venis, M.A., Watson, P.J. Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: Identification as benzoxazolinones. Planta 142, 103-107 (1978).
  62. Morré, D.J. y Cherry, J.H. 5. Auxin hormone-plasma membrane interactions. En Plant Growth Regulation. Proceedings of the 9th International Conference on Plant Growth Substances, Lausanne, August 30-September 4 1976. Pilet, P.E. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp35-43(1977).
  63. Dohrmann, U., Hertel, R. y Kowalik, H. Properties of auxin-binding sites on different subcellular fractions from maize coleoptiles. Planta 140, 97-106 (1978).
  64. Jacobs, M. y Hertel, R. Auxin binding to subcellular fractions from *Cucurbita* Hypocotyls: *in vitro* evidence for an auxin

- transport carrier. *Planta* 142, 1-10 (1978).
65. Cross, J.W., Briggs, W.R. Biochemical Characteristics of solubilized site I Auxin binding protein from *Zea mays*. En Carnegie Institute Year Book 77 pp.353-356 (1978).
  66. Cross, J.W., Briggs, W.R., Dohrmann, U.C. y Ray, P.M. Auxin receptors of maize coleoptile membranes do not have ATPase activity. *Plant Physiol.* 61, 581-584 (1978).
  67. Cross, J.W. y Briggs, W.R. Properties of a solubilized microsomal auxin-binding protein from coleoptiles and primary leaves of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 62; 152-157 (1978).
  68. Cross, J.W. y Briggs, W.R. Solubilized auxin-binding protein. *Planta* 146, 263-270 (1979).
  69. Vreugdenhil, D., Burgers, A. y Libbenga, K.R. A particle-bound auxin receptor from tobacco pith callus. *Plant Sci. Lett.* 16, 115-121 (1979).
  70. Bogers, R.J., Kulescha, Z., Quint, A., Van Vliet, Th. B. y Libbenga, K.R. The presence of a soluble auxin receptor and the metabolism of 3-Indoleacetic Acid in tobacco pith explants. *Plant Sci. Lett.* 19, 311-317 (1980).
  71. Vreugdenhil, D., Harkes, P.A.A. y Libbenga, K.R. Auxin-binding by particulate fractions from tobacco leaf protoplasts. - *Planta* 150, 9-12 (1980).
  72. Libbenga, K.R. 33. Hormone receptors in plants. En *Frontiers of Plant Tissue Culture* pp 325-333 (1978).
  73. Vreugdenhil, D., Burgers, A., Harkes, P.A.A. y Libbenga, K.R.

- Modulation of the number of membrane-bound auxin-binding sites during the growth of batch-cultured tobacco cells. *Planta* 152, 415-419 (1981).
74. Murphy, G.J.P. A reassessment of the binding of naphthalene acetic acid by membrane preparations from maize. *Planta* 149, 417-426 (1980).
  75. Trewavas, A. An auxin induces the appearance of auxin-binding activity in artichoke tubers. *Phytochemistry* 19, 1303-1308 (1980).
  76. Tappesser, B., Wellnitz, D. y Klämbt, D. Auxin affinity proteins prepared by affinity chromatography. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 101, S 295-302 (1981).
  77. Walton, J.D. y Ray, P.M. Evidence for receptor function of auxin binding sites in maize. *Plant Physiol.* 68, 1334-1338 (1981).
  78. Poovaiah, B.W. Strawberry fruit as a model system to study target tissue specificity and the physiological relevance of auxin binding. *Plant Physiol. Supplement* 69, 839 (1982).
  79. Narayanan, K.R., Mudge, K.W. y Poovaiah, B.W. *In vitro* auxin binding to cellular membranes of cucumber fruits. *Plant Physiol.* 67, 836-840 (1981).
  80. Hardin, J.W., Cherry, J.H., Morré, D.J. y Lembi, C. Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released by auxin - from plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 3146-3150 (1972).
  81. Wardrop, A.J. y Polya, G.M. Properties of a soluble auxin-bin

- ding protein from dwarf bean seedlings. *Plant Sci. Lett.* 8, 155-163 (1977).
82. Wardrop, A.J. y Polya, G.M. Co-purification of pea and bean leaf soluble auxin-binding proteins with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* 66, 105-111 (1980).
83. Wardrop, A.J. y Polya, G.M. Ligand specificity of bean leaf soluble auxin-binding protein. *Plant Physiol.* 66, 112-118 (1980).
84. Murphy, G.J.P. Naphthaleneacetic acid binding by membrane-free preparations of cytosol from the maize coleoptile. *Plant Sci. Lett.* 19, 157-168 (1980).
85. Vogel, A.C. *Textbook of Practical Organic Chemistry* pp. 430 Longmans (1961).
86. Zinerholmand & Zimmerman *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 14, 91 (1945).
87. Pérez, L. "Columnas para el aislamiento de receptores auxínicos". Tesis Químico Facultad de Química UNAM (1980).
88. March, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 60, 149-152 (1974).
89. Liberatore, F.A., Isaac, J.E. y Royer, G.P. Immobilized carboxypeptidase Y. Applications in Protein Chemistry *FEBS Lett.* 68, 45-48 (1976).
90. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle

- ciple of protein dye. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
91. Lowry, O.H. En *Methods in Enzimology* Vol. III Section IV pp. 448 Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds. Academic Press Inc. Publishers New York (1957).
  92. Keith, B., Brown, Srivastava, L.M. Comunicación personal.
  93. Bray, G.A. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1, 279-285
  94. O'Farrell, P.H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021 (1975).
  95. Bonner, W.M. & Laskey, R.A. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88 (1974).
  96. Pérez, L. Albores, H, y Sánchez de Jiménez, E. "Columnas para el aislamiento de receptores auxínicos" *Rev. Soc. Quim. de México*. En prensa.
  97. Murphy, G.J.P. Plant hormone receptors: Comparison of naphthaleneacetic acid binding by maize extracts and by a non-plant protein. *Plant Sci. Lett.* 15, 183-191 (1979).
  98. Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. Relevance of old and new messengers RNA in germinating maize embryos. Sometido a publicación en *Plant Physiol.*
  99. Notides, A.C., Lerner, H. y Hamilton, D.E. Positive cooperativity of the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 5926-5930 (1981).

100. Sánchez de Jiménez, E. y Aguilar, R. Comunicación personal  
Departamento de Bioquímica Vegetal. Facultad de Química  
UNAN.