

00381 34  
2y.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Efecto del AIB, el AIA y el Floroglucinol  
sobre la respiración en mitocondrias  
aisladas y la actividad de auxina oxidasas”.

(Y su correlación con la respuesta de formación de raíces  
adventicias en Hipocotilos de *Phaseolus aureus* bajo diferentes  
condiciones).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

266649

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS FUE DESARROLLADO EN LOS LABORATORIOS DE BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGIA VEGETAL DE LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ.

AGRADEZCO SOBREMNERA EL APOYO QUE SIEMPRE RECIBÍ DEL DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ, PARA LA CONCLUSIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL.

MI AGRADECIMIENTO MÁS PROFUNDO A CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ POR SU VALIOSA ASISTENCIA TÉCNICA Y ACADÉMICA, A SERGIO GONZÁLEZ POR SUS CONSEJOS SIEMPRE ATINADOS Y LAS FACILIDADES QUE BRINDÓ PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJ., A JOSEFINA VÁZQUEZ, RAFAEL QUINTANAR Y LUIS PORTILLA POR SU AYUDA EN LA CONFIRMACIÓN DE ALGUNOS RESULTADOS DE ESTA TESIS, A RAMÓN MORENO POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS AL TRABAJO; A GABRIEL CAMARENA QUIEN PERMITIÓ EL DESARROLLO DE ALGUNOS EXPERIMENTOS EN EL LABORATORIO DE FISIOLÓGIA VEGETAL.

AGRADEZCO FINALMENTE EL TIEMPO QUE DEDICARON A LA REVISIÓN CRÍTICA DEL MATERIAL ASÍ COMO LAS VALIOSAS SUGERENCIAS QUE RESULTARON DE ÉSTA, A LOS DOCTORES RAFAEL MORENO SÁNCHEZ, DAVID DÍAZ PONTONES, ALFONSO LARQUÉ SAAVEDRA, BLAS LOTINA HENSEN, ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ, HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA Y MARGARITA COLLAZO ORTEGA.

DEDICO ESTE TRABAJO A QUIENES  
SACRIFICARON MUCHO PARA PERMITIRME  
LLEGAR HASTA AQUÍ. A MI ESPOSA  
MARTHA Y MIS HIJOS ALDIR Y MABEL.

LO DEDICO TAMBIÉN A QUIENES CON SU  
EJEMPLO ME IMPULSARON A CONCLUIRLO:  
MI PADRE, A QUIEN A PESAR DE SU  
FALLECIMIENTO, BRILLA INTENSAMENTE Y  
VIVE SIEMPRE CONMIGO Y DOLORES  
CASTRO, EJEMPLO DE HUMILDAD,  
SENSIBILIDAD E INTELIGENCIA, A QUIEN  
TUVE LA FORTUNA DE TENER POR MADRE.

## RESUMEN

El presente trabajo buscó demostrar que existe una relación entre los procesos que controlan los niveles de ATP y la formación de raíces adventicias en plántulas de frijol mungo. Se comprobó que existe una promoción diferenciada en la formación de raíces adventicias al tratar con 2 auxinas y un metatrifenol, resultando muy superior la capacidad inductora del AIB (que llegó a provocar un 189.92% de incremento en el número de raíces adventicias).

La mayor capacidad promotora del AIB correlacionó con una menor afinidad hacia la principal isoenzima con actividad oxidativa de auxinas *in vitro*, que determina una menor velocidad en su degradación. Particularmente, resultó interesante que la presencia de peróxido de hidrógeno fue indispensable para una actividad significativa en la oxidación del AIB, lo que hace una notable diferencia con respecto a la oxidación del AIA, que si bien es favorecida por el peróxido, hay actividad importante en su ausencia. Estos datos hacen pensar que el nivel del AIB endógeno no es controlado tan eficientemente como el AIA, explicando al menos parcialmente su mayor actividad. El Floroglucinol (FG) promovió la disminución en la formación de sustancias con absorbencia en la región de los 249-251 nm, que puede interpretarse como un abatimiento de la formación de derivados oxindólicos en su presencia. El FG en sistemas *in vitro* no actuó como inhibidor de la oxidación de auxinas, pero sí intervino como antioxidante. Los efectos antioxidantes del FG no fueron suficientes para promover una influencia comparable a la del AIB o de las sustancias que interfieren con la síntesis de ATP sobre la formación de raíces adventicias, por lo que se concluye que la alta respuesta que promueve el AIB en la formación de raíces adventicias parece estar más relacionada con la interferencia que esta auxina produce en la respiración, que con la mayor resistencia que el AIB tiene para ser oxidado. En vista de la baja actividad promotora del enraizamiento mostrada por el floroglucinol, puede inferirse que su papel sea el de proteger a las auxinas del mecanismo que controla sus niveles, que tiene como componente importante el sistema de oxidación y que inactivaría a las auxinas al convertirlas en derivados oxindólicos. La luz no fue capaz de revertir la estimulación lograda por el AIB.

Se evaluó la actividad de oxidasa del AIA en geles de poliacrilamida en los segmentos de plántulas que fueron tratadas con AIA, FG y AIB, encontrándose un incremento en la actividad de las bandas correspondientes a los tratamientos que formaron mayor número de raíces adventicias. Con base en lo anterior se aislaron raíces y tallos de plántulas control y se encontró que las raíces contienen bandas de importante actividad que permiten explicar el incremento observado en los tratamientos. Ante estos resultados se propone, como sistema de control para la respuesta rizogénica, que la isoenzima de mayor carácter catiónico, localizada en la pared celular y de PM 40 KD, sea secretada por las células de la raíz, y se intensifique la degradación de auxinas a través de su actividad. Se tendría una mayor degradación del AIA ( $K_m=41.74\mu\text{M}$ ) con respecto al AIB ( $K_m=74.95\mu\text{M}$ ), con pHs óptimos de 4.5 y 3.9 para la oxidación de AIA y AIB, respectivamente.

El presente trabajo muestra que al evaluar la actividad de oxidasa, es recomendable medir el producto que se forma, el AIA residual y el consumo de oxígeno para tener una imagen más integral y precisa de lo que sucede en este proceso degradativo. Se comprobó que hay una fase de retraso en la oxidación del AIA. Se observaron con claridad 5 isoenzimas con actividad de AIAox y de peroxidasa. La isoenzima de menor movilidad y de mayor

abundancia fue purificada comprobándose mediante isoelectroenfoque y corrimiento electroforético una sola banda con actividad.

Los resultados del presente trabajo establecen que la respiración está estrechamente asociada con la respuesta rizogénica. El AIB presentó un efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial que fue más pronunciado que el que tuvo el AIA, coincidiendo con su mayor efecto promotor del enraizamiento. La oligomicina, a una concentración de 1 µg/ml provocó la mayor estimulación en la formación de raíces adventicias que se pudo obtener en este estudio. También promovieron la respuesta rizogénica: la antimicina (inhibidor de la succinato deshidrogenasa) y el carboxiatractilósido (inhibidor de la tranlocación ADP/ATP). A pesar de haberse buscado una correlación entre el efecto sobre la respiración y la posible alteración en la composición de iones en el citosol, que proporcionara evidencia acerca de la participación de iones como el calcio como mensajero intracelular, los resultados no permitieron ratificar un comportamiento como éste.

# *INDICE*

Justificación	1
Antecedentes	2
Las raíces adventicias	2
La respuesta rizogénica y factores que la afectan	4
Las auxinas y su transporte	12
Metabolismo de auxinas	17
Derivados conjugados de auxinas	22
El mecanismo de acción de las auxinas	26
Otras sustancias relacionadas con la formación de raíces adventicias	35
Interacción hormonal y elementos de respuesta	41
Citocininas, giberelinas y etileno	44
Los reguladores del crecimiento, el balance energético y la respiración	46
Peroxidasas, AIA oxidasas y rizogénesis	48
El $\text{Ca}^{2+}$ , sus efectos y su posible participación como segundo mensajero	56
Objetivo	61
Hipótesis	62
Materiales y Métodos	63
Resultados	77
Discusión	120
Conclusiones	131
Referencias	134

## **Justificación.**

La propagación vegetativa es un método basado en la multiplicación de células obtenidas de un individuo a partir de las cuales se generan nuevos individuos genéticamente idénticos al original. En la medida en que este tipo de propagación pueda utilizarse en cualquier especie vegetal, se tendría la oportunidad de mantener líneas con aquellas características de mayor importancia para el hombre, además de poder perpetuar clonas de plantas sin semillas y de alcanzar estados de madurez más rápidamente (Janick et al, 1974).

La incapacidad para inducir la formación de raíces adventicias es, a menudo, factor limitante para la clonación cuando se usan estacas (segmentos de tallo, hoja o raíz) o cultivo de tejidos de especies leñosas (aquellas que tienen paredes celulares lignificadas) en las que la maduración frecuentemente va acompañada de una reducida capacidad de enraizamiento. En algunos casos, la habilidad para formar raíces está ausente en la fase de maduración, esto ha afectado grandemente la explotación genética de plantas leñosas en horticultura y ciencias forestales. Un dilema frecuente es que cuando las plantas son suficientemente maduras para identificar sus cualidades superiores, se dificulta o imposibilita su propagación por enraizamiento (Haissig et al, 1992)

La importancia del presente trabajo se fundamenta precisamente en la premisa de que en la medida que se conozcan los mecanismos que dirigen el proceso de desdiferenciación y rediferenciación de los tejidos vegetales, se contará con elementos suficientes para establecer y aplicar métodos de propagación que resuelvan las dificultades que hasta ahora se han



tenido en este sentido. Si bien se ha realizado investigación fisiológica y bioquímica para entender el control del enraizamiento, a pesar de ello, la biología fundamental de este importante fenómeno de desarrollo es aún oscura (Haissig et al, 1992). Por lo anterior, en el presente trabajo se buscó demostrar si las auxinas afectan los procesos de formación de raíces adventicias a través de sus efectos sobre la actividad respiratoria mitocondrial.

## ***Antecedentes***

### **Las Raíces Adventicias.**

Las raíces adventicias se definen como aquellas que se originan en lugares diferentes del sistema de raíces primario, en este sentido, corresponden a raíces secundarias o laterales que surgen de tejidos del tallo y no en la raíz (la figura 1 muestra las raíces primarias y las raíces secundarias, las raíces adventicias son prácticamente iguales a estas últimas). Así, un segmento, quizás un pedazo de material de tallo desprendido de la planta madre podría, bajo ciertas condiciones, producir raíces adventicias y consecuentemente, un nuevo sistema de raíces y una planta completa. Aún cuando difieren en su origen, las funciones fisiológicas de los dos tipos de raíz son esencialmente las mismas (Blakesley et al, 1991). Los tejidos capaces de generar raíces adventicias son las zonas meristemáticas secundarias, que en algunas especies y en ciertos órganos pueden distribuirse regularmente.

Se ejemplifica esta situación en el trabajo de Friedman, Altman y Zamski (1979), donde se reporta que las raíces adventicias en frijol mungo se arreglan en cuatro hileras paralelas, ubicadas entre los 4 pares de haces vasculares en segmentos de hipocotilo, en

tenido en este sentido. Si bien se ha realizado investigación fisiológica y bioquímica para entender el control del enraizamiento, a pesar de ello, la biología fundamental de este importante fenómeno de desarrollo es aún oscura (Haissig et al, 1992). Por lo anterior, en el presente trabajo se buscó demostrar si las auxinas afectan los procesos de formación de raíces adventicias a través de sus efectos sobre la actividad respiratoria mitocondrial.

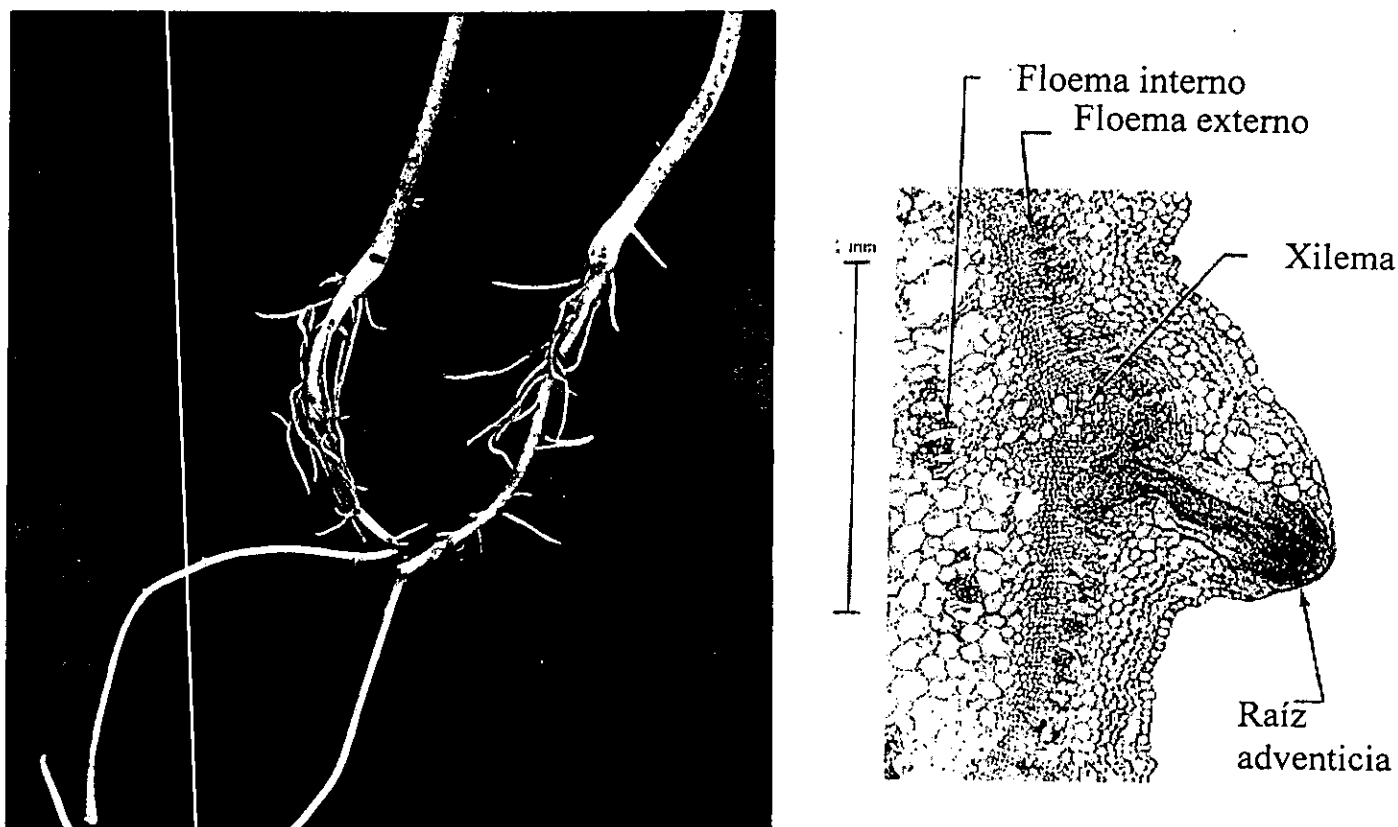
## ***Antecedentes***

### **Las Raíces Adventicias.**

Las raíces adventicias se definen como aquellas que se originan en lugares diferentes del sistema de raíces primario, en este sentido, corresponden a raíces secundarias o laterales que surgen de tejidos del tallo y no en la raíz (la figura 1 muestra las raíces primarias y las raíces secundarias, las raíces adventicias son prácticamente iguales a estas últimas). Así, un segmento, quizás un pedazo de material de tallo desprendido de la planta madre podría, bajo ciertas condiciones, producir raíces adventicias y consecuentemente, un nuevo sistema de raíces y una planta completa. Aún cuando difieren en su origen, las funciones fisiológicas de los dos tipos de raíz son esencialmente las mismas (Blakesley et al, 1991). Los tejidos capaces de generar raíces adventicias son las zonas meristemáticas secundarias, que en algunas especies y en ciertos órganos pueden distribuirse regularmente.

Se ejemplifica esta situación en el trabajo de Friedman, Altman y Zamski (1979), donde se reporta que las raíces adventicias en frijol mungo se arreglan en cuatro hileras paralelas, ubicadas entre los 4 pares de haces vasculares en segmentos de hipocotilo, en

contraste con su desarrollo irregular en segmentos de pecíolo y epicotilo, en los que la distribución de los haces vasculares es también irregular. Se reporta también que la aplicación acropétala o basipétala de auxinas incrementa el número de raíces, pero no modifica el patrón de su emergencia.



*Figura 1. A la izquierda, se ilustra la raíz primaria (A) y las raíces secundarias (B). La raíz primaria emerge de la radícula, del hipocotilo de la semilla germinada, o de ambas partes. Crece hacia abajo y se ramifica repetidamente para producir raíces laterales o secundarias. A la derecha se muestra un corte que permite observar la formación de raíces adventicias y la organización de los tejidos conductores alrededor de ésta.*

## **La respuesta rizogénica y factores que la afectan.**

El estímulo para la iniciación de la respuesta rizogénica puede variar entre especies de plantas, edades y otras condiciones. El daño mecánico, la sección de partes de una planta, el contacto con el suelo, son algunos de los factores más importantes que desencadenan esta respuesta (Weaver, 1972).

El primer intento real para construir una teoría al respecto de la formación de raíces a partir de tallos fue obra de Julius Sachs, quien en 1882 propuso que para formar las hojas, las raíces y los tallos, actúan sustancias específicas (citado por Salisbury, y Ross, 1994). La sustancia formadora de raíces propuesta por Sachs podría ser sintetizada en las hojas y migrar a las partes más bajas de las plantas estimulando ahí al tejido del tallo para producirlas. Hasta 1924, el holandés Van der Lek hizo el primer estudio experimental (citado por Thimann, 1977). Encontró que en algunos casos gran número de iniciales de raíz ya estaban presentes en el tallo y todo lo que ocurría al colocarlos en la humedad del suelo era que crecían. En otros casos era claro que la formación de raíces era dependiente de un estímulo, que típicamente era proporcionado por las hojas. Van der Lek pudo demostrar que la formación dependía de la presencia de las hojas; las raíces siempre se formaban abajo de las hojas (en coincidencia con la propuesta de Sachs, el sentido del movimiento era de las hojas hacia abajo) y cuando las raíces se formaban en pequeño número, lo hacían del mismo lado del segmento en el que se encontraban las hojas (Thimann, 1977).

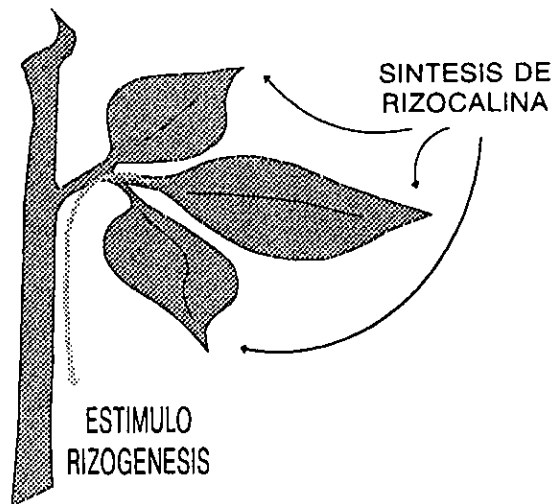


Figura 2. La Rizocalina fue el nombre que se le dio a la sustancia hipotética que se suponía fabricada en las hojas y estimulaba el enraizamiento. (Según Thimann, 1977)

Siguiendo el trabajo de Van der Lek, Went y Bouillene, en Java, observaron que al trabajar segmentos del arbusto tropical *Acalypha wilkesiana*, se formaban pocas o ninguna raíz, sin embargo, la aplicación de extractos acuosos de la hoja producía un pequeño pero real incremento en el número de raíces. Influenciados por el descubrimiento de la tiamina en la cascarilla de arroz por Jansen y Donath en 1926, Went y Bouillene probaron el efecto de extractos de cascarilla de arroz sobre segmentos defoliados obteniendo muy buen enraizamiento. Así, la "influencia" o "estímulo" proveniente de las hojas podría ser reemplazado por una sustancia extraíble, concentrable y que podía ser preservada. Went fue a California y trabajó con Thimann para aislar esta sustancia formadora de raíces. Como el extracto de cascarilla de arroz no se obtenía fácilmente en California, se investigaron otras fuentes. Una de las mejores fuentes de la llamada "rizocalina" (figura 2) era el medio de crecimiento de *Rhizopus suimus*, que era usado en ese tiempo como fuente de auxina (citado

por Thimann, 1977). Así, aunque Curtis (1918) y Zimmerman y colaboradores (1933) proponían respectivamente que el permanganato y el monóxido de carbono incrementaban el enraizamiento de estacas (Weaver, 1972), en 1934, Thimann y Went señalaron que las auxinas ejercen el control primario en la formación de raíces (citados por Thimann y Delisle, 1939). El ácido indolacético (AIA) fue la primera hormona vegetal usada en el enraizamiento (Cooper, 1935). En el mismo año Zimmerman y Wilcoxon (1935) descubrieron que varias auxinas sintéticas entre ellas el AIB<sup>1</sup>, también promovían el enraizamiento. Se han realizado varios trabajos a partir de este descubrimiento, encontrándose en la mayoría de los casos, un incremento en el número de raíces formadas al tratar estacas de plantas con auxinas (Alvarez et al, 1989; Bachelard y Stowe, 1963; Batten y Goodwin, 1978; Blakesley et al, 1991; Bose et al, 1972; Eliasson y Arebald, 1984; Gorter, 1969; Haissig et al, 1992; Hartman y Kester, 1983; James, 1983a; Jarvis y Booth, 1981; Jarvis y Shaheed, 1986; Nordström et al, 1991), aunque en plantas de difícil enraizamiento las auxinas pueden no ser el factor limitante para la iniciación (Hartmann y Kester, 1983). Por ejemplo: los segmentos de plántulas de muchas especies leñosas perennes inician fácilmente el enraizamiento adventicio, especialmente si se tratan con auxinas, pero esta capacidad se pierde en unos pocos meses o años después de la germinación, a pesar del tratamiento con auxinas (Hackett, 1985; 1988; Hartmann y Kester, 1983).

---

<sup>1</sup> Aunque el AIB fue identificado como un producto natural en cáscara de papa desde hace 43 años (Blommaert, 1954), es aún referido como auxina sintética. Schneider y colaboradores (1985) encontraron AIB en chícharo, sin que éste se hubiera aplicado exógenamente, este reporte se suma a varios más, que particularmente hacia las últimas 2 décadas han demostrado la presencia del AIB como componente natural de diversas plantas (Bayer, 1969; Brunner, 1978; Epstein y Ludwig-Müller, 1993).

Al descubrirse que las auxinas desempeñan un importante papel en la formación de raíces, se supuso que las estacas que no enraizan fácilmente, carecen de los niveles adecuados de éstas y que al proporcionarles la cantidad faltante deberían hacerlo. Por muchos años, la única evidencia de la participación de las auxinas en la iniciación de raíces adventicias provino de estudios en los que se aplicaron exógenamente (Blakesley et al, 1991). Las hojas y yemas, que son sitios conocidos que las producen (Moore, 1969) son necesarias para la iniciación de raíces en varias especies y su reemplazo por auxina añadida ha sido parcial o completamente exitoso en la estimulación del enraizamiento adventicio en algunas especies (Roberts y Fuchigami, 1973; Haissig, 1970b; Eriksen y Mohammed, 1974). La lista de plantas que responde ante la aplicación de auxinas es ahora bastante grande (Hartmann et al, 1990; Bachelard y Stowe, 1963; Weaver, 1972). La concentración de auxina aplicada exógenamente varía de especie a especie (Thimann y Delisle, 1942). Se han estudiado muchas sustancias que se comportan como auxinas como los ácidos indolacético (AIA), indolpropiónico (AIP), indolbutírico (AIB), naftalenacético (ANA), benzofurano acético, 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2 metil-4 clorofenoxipropiónico (MCP). El menos estable de éstos es el AIA (Bachelard y Stowe, 1963), el más efectivo para estimular alargamiento, al menos en cereales, es el MCP (Sánchez de Jiménez et al, 1981) y los que promueven con mayor eficiencia la formación de raíces adventicias son el AIB y el ANA (Alvarez et al, 1989). Se ha propuesto que la mayor estimulación que promueven el AIB y el ANA puede deberse a que no exista la maquinaria para su degradación, sin embargo, Riov y Epstein (1988) mostraron en *Phaseolus mungo* que las velocidades de degradación del AIA y el AIB son semejantes, aunque se encuentran diferencias en los productos que resultan de

ésta pero hasta ahora, no existen reportes en los que se comparen las afinidades de estas dos auxinas hacia una enzima capaz de oxidarlas.

Se piensa que las auxinas funcionan sobre todo en los primeros estadios de diferenciación para la formación de primordios de raíces. Haissig (1970b) encuentra que al aplicar [ $^{14}$ C-AIA], las células de los primordios de raíz lo incorporan, sobre todo en la fase más temprana de la iniciación de este proceso. Smith y Thorpe (1975a y b, 1976) encuentran en cortes histológicos de *Pinus radiata*, que las auxinas promueven sobre todo la formación de los primeros estadios de diferenciación.



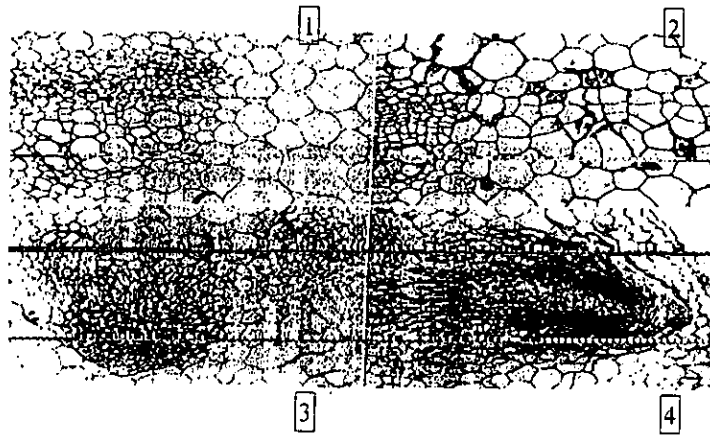
Figura 3. Diagrama que muestra las etapas de inducción de raíces en especies leñosas y la influencia de las auxinas en la determinación (Meins y Binns, 1979; Christianson y Warnick, 1983).



La regeneración de raíces o la formación de raíces adventicias en segmentos de tallo u hoja comprende 4 etapas principales (ver figura 3): 1) Desdiferenciación y formación de un nuevo locus meristemático. 2) División celular temprana, que conduce a la formación de agrupaciones celulares sin polaridad y radialmente simétricas, las células aún no están determinadas; 3) División celular tardía que conduce a la formación de un meristemo organizado y determinado hacia la formación de raíces, con simetría bilateral y 4) Formación de la raíz por crecimiento en extensión de las células producidas por el meristemo. Smith y Thorpe (1975a) observaron que el desarrollo de raíces adventicias en hipocotilos de *Pinus radiata* se origina en los márgenes de los ductos de resina en diferenciación o en el tejido parenquimatoso; en *Pinus taeda* L, las raíces se forman a partir de una región pequeña de parénquima cortical inmediatamente hacia afuera de los canales resiníferos, que marcaron a menudo cuatro polos de xilema primario en cortes transversales de hipocotilo (Díaz-Sala et al, 1996). De acuerdo con Smith y Thorpe (1975), el primer signo visible de un nuevo locus meristemático fue la expansión de una célula simple, con hinchamiento nuclear simultáneo. El citoplasma de tales células era mucho más denso que el de las células adyacentes. Estos eventos tempranos parecen ser característicos de un locus meristemático y han sido reportados en otras especies entre las cuáles se cuenta al frijol mungo (Blazich y Heuser, 1979).

La ocurrencia de raíces en posición próxima a la nervadura puede deberse a la presencia de reguladores del crecimiento endógenos u otras sustancias en ésta, a una

incorporación incrementada de reguladores de crecimiento exógenos o a una combinación de ambas situaciones (Attfield y Evans, 1991a). Recientemente, se ha reportado que la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*, se inicia en tejido que previamente no se dividía activamente, a partir de alrededor de 11 células “localizadoras” dentro del periciclo (Scheres et al, 1996).



*Figura 4. Se ilustra la formación de los primordios de raíz en Helianthus annuus (tomado de Fabijan et al, 1981). Cuadro 1: Sección transversal del haz vascular al día cero. Cuadro 2: Sección transversal del segmento de hipocotilo al día 1. Pueden observarse divisiones periclinales y anticlinales en las células del parénquima interfascicular. Cuadro 3: Sección transversal del segmento de hipocotilo al día 2. Puede observarse un primordio de raíz en desarrollo. Cuadro 4: Sección transversal a través del hipocotilo al día 3 mostrando raíces adventicias bien desarrolladas.*

Se han reconocido 2 patrones de formación de raíces en segmentos de especies tanto herbáceas como leñosas (Hartman et al, 1990). Uno que involucra la formación directa de primordios de raíces adventicias a partir de células asociadas con o en estrecha proximidad

con el sistema vascular, como puede observarse en la figura 4. El segundo patrón es la formación indirecta de raíces adventicias involucrando un período intermedio de divisiones de células indiferenciadas. Al seleccionarse células dentro de estas divisiones subsecuentes, eventualmente se organizan para formar un primordio de raíz adventicia. En general, las especies herbáceas y las especies leñosas fáciles de enraizar forman raíces a través del patrón directo de formación de raíces, mientras que las especies difíciles de enraizar lo hacen a través del patrón indirecto.

Debe distinguirse entre los primordios de raíz que han sido inducidos *de novo* y aquellos que son preformados. Las iniciales de raíz preformadas son producidas en la planta intacta durante su desarrollo normal; comúnmente son de desarrollo lento y se encuentran casi exclusivamente en especies leñosas. Su sitio de formación varía entre especies aunque frecuentemente derivan del tejido radial (Fink, 1972) y de regiones nodales (Haissig, 1970a). Los primordios de raíces adventicias inducidas son aquellos que se forman en respuesta a la herida que resulta de realizar cortes, siendo los segmentos obtenidos los que los producen (Blakesley et al, 1991).

En general se requiere una alta concentración de auxina sólo durante la fase de iniciación y el crecimiento posterior de las raíces es inhibido por altas concentraciones de auxina (De Klerk et al, 1990). Se emplean 2 métodos para remover el AIB en la fase de emergencia de las raíces: el tejido puede ser transferido a un medio libre de auxinas, o puede

usarse la combinación de aplicación de luz y riboflavina para oxidar al AIB (Gorst et al. 1983).

### **Las auxinas y su transporte.**

Las auxinas participan en la regulación de varios procesos de crecimiento y desarrollo, tales como el alargamiento, división y diferenciación celular que conducen a la curvatura de coleoptilos, el desarrollo de tejidos vasculares, la formación de raíces laterales y adventicias, la inhibición del crecimiento de las yemas axilares, las respuestas trópicas, la prevención de la abscisión (o caída) de los frutos, y la inducción de la partenocarpia (o desarrollo sin fecundación) en frutos (Kefeli, 1978; Tuominen et al, 1995; Valero y Labrador, 1995 y Abel y Theologis, 1996).

Salisbury y Ross (1994) proponen que las auxinas naturales son cuatro: el ácido indolacético (AIA), el ácido 4-cloro-indolacético (4-cloroAIA), el ácido fenilacético (APA) y el ácido indolbutírico (AIB); sin embargo, poco se conoce acerca del transporte de los 3 últimos y si de hecho funcionan normalmente como hormonas vegetales.

El sitio de síntesis de las auxinas es el meristemo apical de tallos y raíces. La cantidad de auxinas que se forman en el ápice de los tallos es mucho mayor que la sintetizada por la raíz (Cline, M.G., 1994). Los reportes publicados sobre la biosíntesis de auxinas en raíces, evidencian que la cantidad máxima de AIA en raíz está contenida en el ápice (Boysen-Yensen, 1936 citado por Kefeli, 1978). Se ha confirmado la presencia de auxinas naturales en raíces mediante cromatografía en papel. Producidas en el ápice de la raíz, las auxinas

parecen ser transportadas adecuadamente, siendo su translocación acropétala, a diferencia de lo que ocurre en los órganos aéreos (Kefeli, 1978).

Las raíces poseen un sistema altamente desarrollado para la oxidación del AIA. Debe notarse que, aunque el ápice de la raíz contiene una relativa gran cantidad de auxinas, la oxidación del AIA es la más débil en esta zona (Pilet, 1957). Konings (1965) demostró al introducir [ $^{14}\text{C}$ -AIA] en raíces de *Pisum sativum*, que la máxima cantidad de  $^{14}\text{C}$ -AIA se acumulaba en la parte más inferior del segmento. Si en cambio, las raíces se trataban con un inhibidor de la AIA oxidasa (ácido cafeico), no se observó ninguna diferencia en el contenido de  $^{14}\text{C}$ -AIA entre las porciones superior e inferior, interpretándose que el AIA no se descompuso en la porción superior dada la inhibición de la actividad de AIA oxidasa en la misma. En contraste, la adición de ácido p-coumárico aceleró la descomposición del AIA en ella. Los resultados antes señalados llevan a sugerir que el gradiente de concentración de AIA se debe a un gradiente de actividad de AIA oxidasa (como se ilustra en la figura 5).

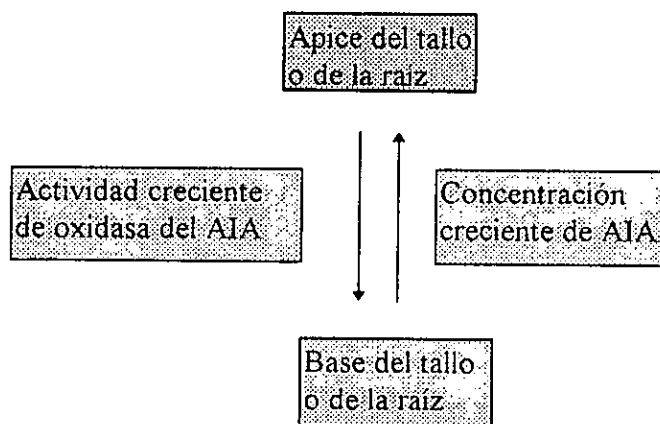


Figura 5. Esquema que muestra la correlación existente entre la actividad de AIAox y la concentración de AIA. (De acuerdo a Konnings, 1965).

El método más exitoso para inducir la formación de raíces adventicias hasta ahora ha sido la aplicación exógena de auxinas "sintéticas" (ANA y AIB) a segmentos de tallo cultivados *in vitro* (Alvarez et al, 1989). La aplicación de AIB determina que los meristemas en *Salix fragilis* puedan formar primordios de raíz que en su ausencia forman parénquima (Haissig, 1970a); en *Phaseolus aureus*, el AIB tiene un importante efecto promotor sobre la formación de raíces laterales (Jarvis, 1986; Jarvis y Yasmin, 1985).

Se ha explorado la relación entre niveles endógenos de auxina libre y capacidad rizogénica, por ejemplo, en estacas de *Malus pumila* se ha encontrado que la mayor concentración de AIA libre en la base del tallo de la variedad M.26 se relaciona con una mayor capacidad rizogénica, con respecto al de la variedad M.9 (en la que se encuentra una mayor proporción de AIA conjugado) (Alvarez et al, 1989). Weigel et al (1984) han encontrado una correlación positiva entre los niveles endógenos de auxinas en segmentos de tallo de *Chrysanthemum morifolium* y el número de raíces formadas 20 días después, Blakesley (1994) ha mostrado un incremento temprano (en las primeras 24 hs después de hacer el corte) en el AIA libre asociado con la formación de raíces adventicias en diferentes especies.

Las auxinas endógenas son transportadas polarmente, en dirección basipétala (Eliasson, 1972), la mayor parte de ellas se mueve longitudinalmente, y sólo muy pequeñas cantidades son translocadas lateralmente. El aumento en la velocidad de transporte

correlaciona con la promoción del crecimiento. En contraste, las auxinas aplicadas exógenamente se mueven principalmente en dirección acropétala, sin que para este movimiento exista gasto de energía, llevándose a cabo como resultado del movimiento del agua provocado por la transpiración (Hoard et al, 1971). (Ver figura 6). Sin embargo, se sugiere que las auxinas exógenas deban ser incorporadas a sistemas de transporte basipetalico para que induzcan la formación de raíces adventicias, en tanto que los bloqueadores del transporte como el ácido naftilftalámico inhiben el enraizamiento (Díaz-Salá et al, 1996).

Se ha demostrado que el ácido triiodobenzoico (TIBA) y la morfactina son potentes inhibidores de este proceso (Goldsmith, 1977 y Rubery, 1981). Los datos relacionados con la incorporación, distribución y metabolismo de las auxinas aplicadas a estacas son limitados (Jarvis y Shaheed, 1986) y sobre todo se han hecho con estacas leñosas (James, 1983b, Díaz-Salá et al, 1996)). Aunque el *Phaseolus aureus* se ha utilizado en el bioensayo para evaluar la respuesta rizogénica, en esta especie hay pocos estudios sobre transporte de auxinas. Jarvis y Shaheed (1986) interpretan de estudios realizados con 2 inhibidores del transporte de auxinas que el factor que promueve la formación de raíces laterales en *Phaseolus aureus* es el AIA que se transporta en dirección basipétala, y que este transporte se estimula con la aplicación basal de AIA (Jarvis y Shaheed, 1986) y AIB (Jarvis y Booth, 1981), aunque se ignora cómo se logra este efecto.

La velocidad de transporte del AIA en plántulas decapitadas y en secciones de hipocotilos etiolados oscila entre 3 y 30 mm h<sup>-1</sup>, aumentando hacia las zonas más jóvenes y superiores y disminuyendo hacia las más viejas y basales (Sánchez-Bravo et al, 1992). El transporte de auxinas ha sido intensamente investigado por décadas y se han sugerido diversas hipótesis para dar cuenta de las características del proceso (Goldsmith, 1977; Rubery, 1981), sin que se cuente con un mecanismo con soporte experimental suficiente para explicar el crecimiento diferencial observado (Sánchez-Bravo et al, 1992).

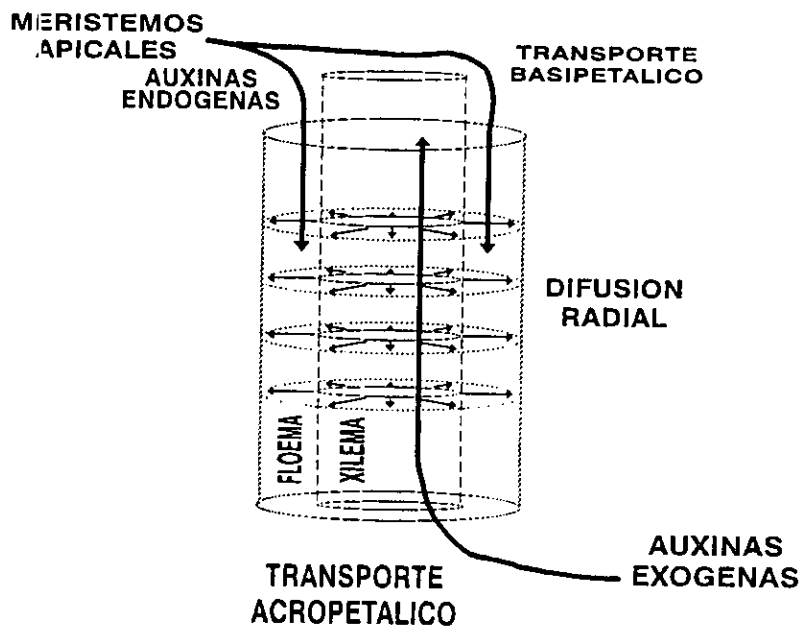


Figura 6. Translocación de auxinas. Se muestra el ascenso de las auxinas exógenas por xilema y el transporte basipetalico por vía del floema. (De acuerdo a Hoard et al, 1971 y Eliasson, 1972).

Las auxinas entran a las células porque son ácidos débiles lipofílicos permeables a la membrana (Sitbon y Perrot-Rechenmann, 1997). El transporte transmembranal del AIA es además catalizado por acarreadores específicos de incorporación y de eflujo para aniones del



AIA (que es la forma más abundante en el citosol) (Goldsmith, 1977; Delbarre et al, 1996). La proteína involucrada en el control del eflujo de auxinas es el receptor para el ácido naftilftalámico, que es una proteína integral (Bernasconi et al, 1996) y que se ha relacionado con el transporte polar de las auxinas a nivel de toda la planta, mientras que la función del acarreador de influjo es aún desconocida (Delbarre et al, 1996). La polaridad característica del transporte de auxinas resulta de diferencias en la actividad translocadora de AIAH y de AIA<sup>-</sup> por parte de las regiones de membrana plasmática de cada extremo de las células que transportan esta auxina (Wilkinson y Morris, 1994). Estas diferencias se atribuyen a la asimetría en la distribución de acarreadores que provocan el eflujo de auxina (Allan y Rubery, 1991). Lo anterior se soporta en que la aplicación de ácido naftilftalámico (inhibidor del transporte polar de auxinas) y otras fitotropinas estimulan la incorporación neta de auxina a partir de soluciones externas e inhiben fuertemente su eflujo a partir de células precargadas (Goldsmith, 1977; Michalke et al, 1992). Por otra parte, al preparar anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína que enlaza ácido naftilftalámico, se asocian preferentemente a la región basal de las células involucradas en el transporte (Jacobs y Gilbert, 1983).

### **Metabolismo de auxinas.**

Hasta que se desarrollaron métodos de separación muy eficientes como la cromatografía de gases-espectrometría de masas (Normanly et al, 1995) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Östin et al, 1992; Tuominen et al, 1995); se había dificultado la determinación precisa del AIA en tejidos vegetales (Schneider y Wightman, 1974). Se ha reconocido como precursor inicial del AIA al ácido shikímico (Kefeli, 1978).

Como un intermediario posterior se ha considerado al triptófano, por su estrecha similitud química con el AIA y especialmente después de la demostración realizada por Thimann (1974), en la que los cultivos de *Rhizopus strombos* forman AIA cuando se alimentan con triptófano. Se ha mostrado también con experimentos *in vivo* que el triptófano marcado con <sup>14</sup>C puede ser convertido a AIA en rebanadas de sandía, tallos de tomate, frutos de lima, tallos de tabaco, hipocotilos de pepino, preparaciones libres de células de frijol mungo, y en tejidos de diferentes plantas (Schneider y Wightman, 1974). Gaspar y Hofinger (1987) describen que el triptófano puede seguir 3 rutas alternativas hacia la formación del AIA: 1) El triptófano se transamina a indolpiruvato, mediante la triptófano aminotransferasa; el indolpiruvato se descarboxila formando indolacetaldehído y éste último se oxida (en frijol mungo) mediante la indolacetaldehído deshidrogenasa-NAD dependiente. 2) El triptófano se descarboxila mediante la triptófano descarboxilasa, para transformarse en triptamina, que a su vez se transforma en indolacetaldehído por la acción de una amina oxidasa. 3) Se forma indolacetaldoxima a partir de triptófano y ésta se convierte en indolacetonitrilo, mediante la indolacetaldoxima deshidratasa y el indolacetonitrilo se hidroliza para formar indolacetato. Sin embargo, Baldi (1991) reporta una baja incorporación de marca radioactiva proveniente del triptófano en el AIA. Michalczuk et al, (1992) han reportado que el 2,4-D puede influir importantemente en la síntesis del AIA, provocando una estimulación de hasta 7 veces este proceso a partir de triptófano en embriones somáticos de *Daucus carota*.

En la mayoría de las plantas, se sintetiza AIA a partir del triptófano vía el ácido indolpirúvico, mientras que las vías de la triptamina y la indolacetaldoxima se siguen sólo en

algunas especies (figura 7) (Schneider y Wightman, 1974). Recientemente se ha reportado indolacetaldoxima como producto de la oxidación del triptófano mediante una peroxidasa catiónica en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Ludwig-Muller y Hilgenberg, 1992).

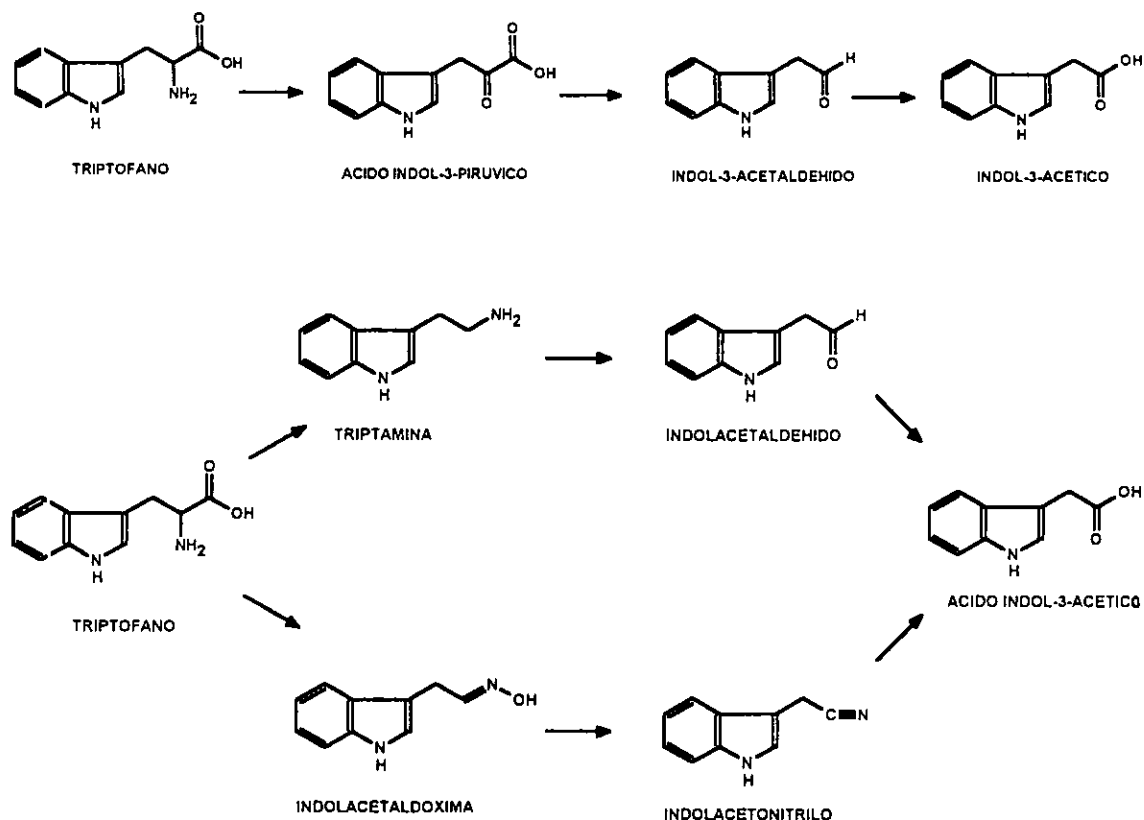


Figura 7. Se muestran las reacciones que conducen a la síntesis de AIA a partir de Triptófano. Se representan las 3 vías que conducen a su síntesis, de acuerdo a Schneider y Wightman (1974) y Ludwig-Muller y Hilgenberg (1992).

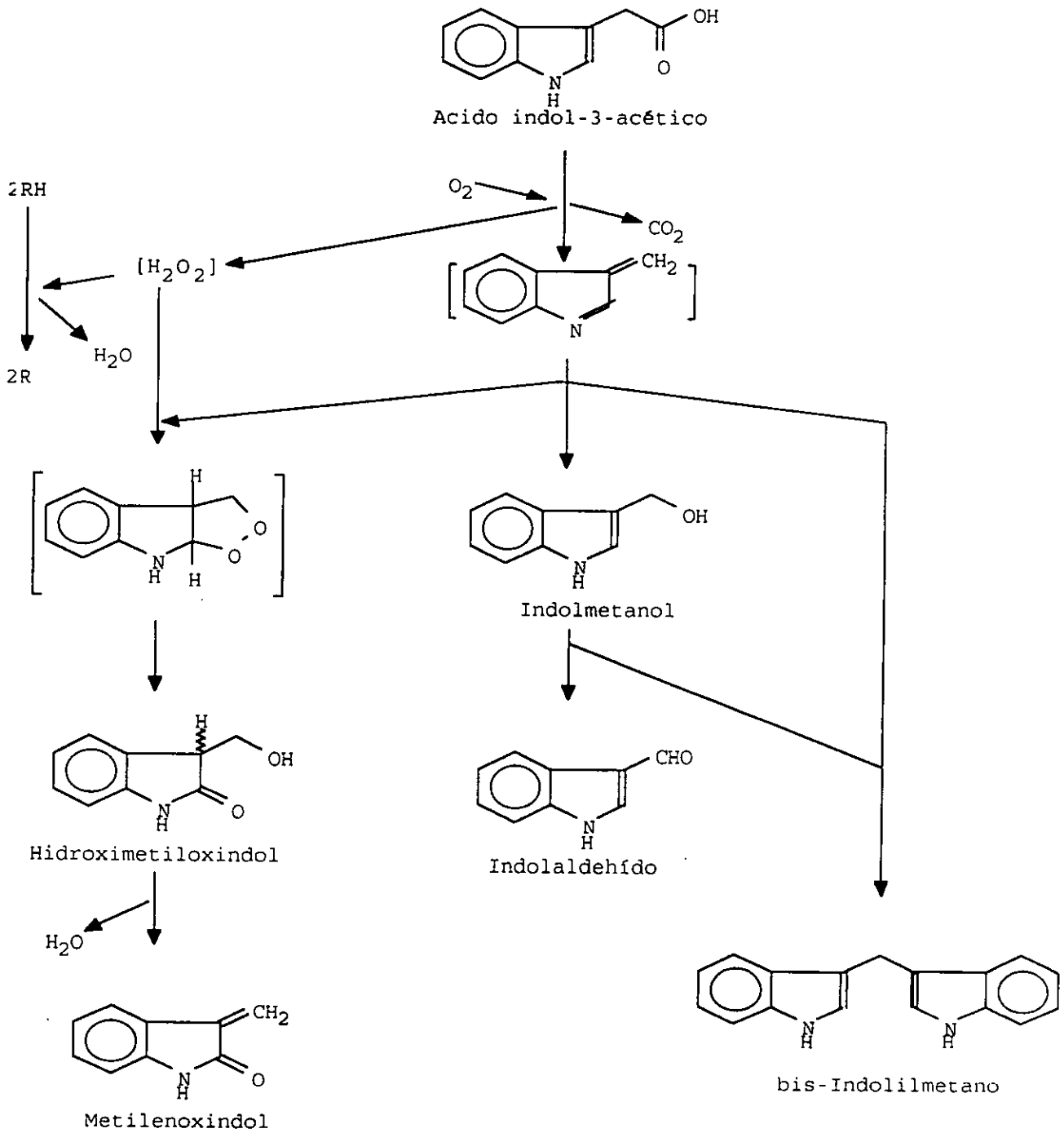


Figura 8. Se representan las vías oxidativas del AIA, observándose que la formación de metilenoindol (vía oxindólica) depende de la presencia de  $H_2O_2$ , mientras que los productos de oxidación que no dependen del peróxido de hidrógeno son indolmetanol, indolaldehído y bis-indolilmetano (vía indólica). Adaptado de Grambow y Lagenbeck Schwich, 1983).

El AIA es un compuesto lábil que puede ser degradado por factores tales como el pH ácido, el calor, la luz, agentes oxidantes, peróxidos o metales pesados. El llamado sistema de AIA-oxidasa, que funciona en presencia o ausencia de  $H_2O_2$ , manganeso y/o monofenoles como cofactores, se considera constituido por una o más isoperoxidasas. Cualquier tipo de peroxidasa puede destruir al AIA *in vitro*, pero sólo las peroxidases básicas (catiónicas) actúan como AIA-ox *in vivo* (Gaspar et al, 1982). Hay 2 principales vías del catabolismo del AIA en plantas: Una oxidación descarboxilativa (figura 8) y una vía no descarboxilativa que produce ácido oxindol-3-acético y sus derivados hidroxilados (Reinecke y Bandurski, 1988). La vía oxidativa-decarboxilativa, tiene como principales productos descarboxilados al indol-3-metanol, al 2-hidroximetiloxindol (Grambow y Lagenbeck Schwich, 1983; García-Florenciano et al, 1992), 3-metilenoxindol (Schneider y Wightman, 1974), 3-hidroximetiloxindol e indol 3-aldehído (Nakono et al, 1982). La oxidación del AIA por la peroxidasa de rábano parece involucrar la formación de los Compuestos I, II y III<sup>2</sup> de la enzima y los radicales indolacetilperoxi pueden ser intermediarios importantes. Dependiendo de las condiciones físicas y bioquímicas, el AIA que es degradado por las peroxidases puede producir 3-metilenoxindol o indol-3-aldehído (Grambow y Lagenbeck-Schwich, 1983). Sandberg et al (1984) han encontrado indolmetanol y ácido indolcarboxílico como constituyentes naturales en tejidos de pino, que

---

<sup>2</sup>El compuesto III se forma a partir de la reacción entre Ferropoxidasa y  $O_2$  (oxiferropoxidasa). El compuesto I se puede formar a partir de la reacción entre la peroxidasa de rábano y el AIA-peróxido y el compuesto I al reducirse por una molécula de AIA forma el compuesto II. El compuesto II produce ferriperoxidasa al reaccionar con una segunda molécula de AIA.

probablemente deriven del indolaldehído. Más recientemente, Winer et al (1993), han identificado la indol-3-aldehído oxidasa que cataliza la oxidación del indolaldehído para formar ácido indolcarboxílico + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La oxidación del AIA es afectada por compuestos fenólicos tanto de alto como de bajo PM (Mato et al, 1988) por manganeso (Gaspar et al, 1982), ácidos carboxílicos (malato, citrato, piruvato) (Pressey, 1990) y otros aniones (Pressey, 1990). La actividad protectora hacia la oxidación de auxinas que muestran las coumarinas y algunos fenoles parecen involucrar la reacción preferencial con los compuestos II y III de la peroxidasa.

#### **Derivados conjugados de auxinas.**

Las auxinas como el AIA no se encuentran solamente en forma libre en las plantas, sino también en forma de diferentes complejos que por cierto son extremadamente lábiles. La mayor parte del AIA producido en las plantas se encuentra conjugado en dos formas generales: conjugados con azúcares mediante enlaces éster y conjugados con aminoácidos o péptidos mediante enlaces amida, siendo estos últimos los más abundantes en las dicotiledóneas (Campanella et al, 1996). Entre los conjugados pueden mencionarse: AIA unido a proteínas (Thimann, 1965), AIA-glucosa, AIA-aspártico e indolacetamida, además, se reportan conjugados de AIB, AIP y 2,4-D con el ácido aspártico, así como la glucobrasicina y neoglucobrasicina (Kefeli, 1978) (Figura 9). El principal derivado conjugado del AIA es el indolacetilaspártato (Mollan, 1972; Sasaki, 1992).

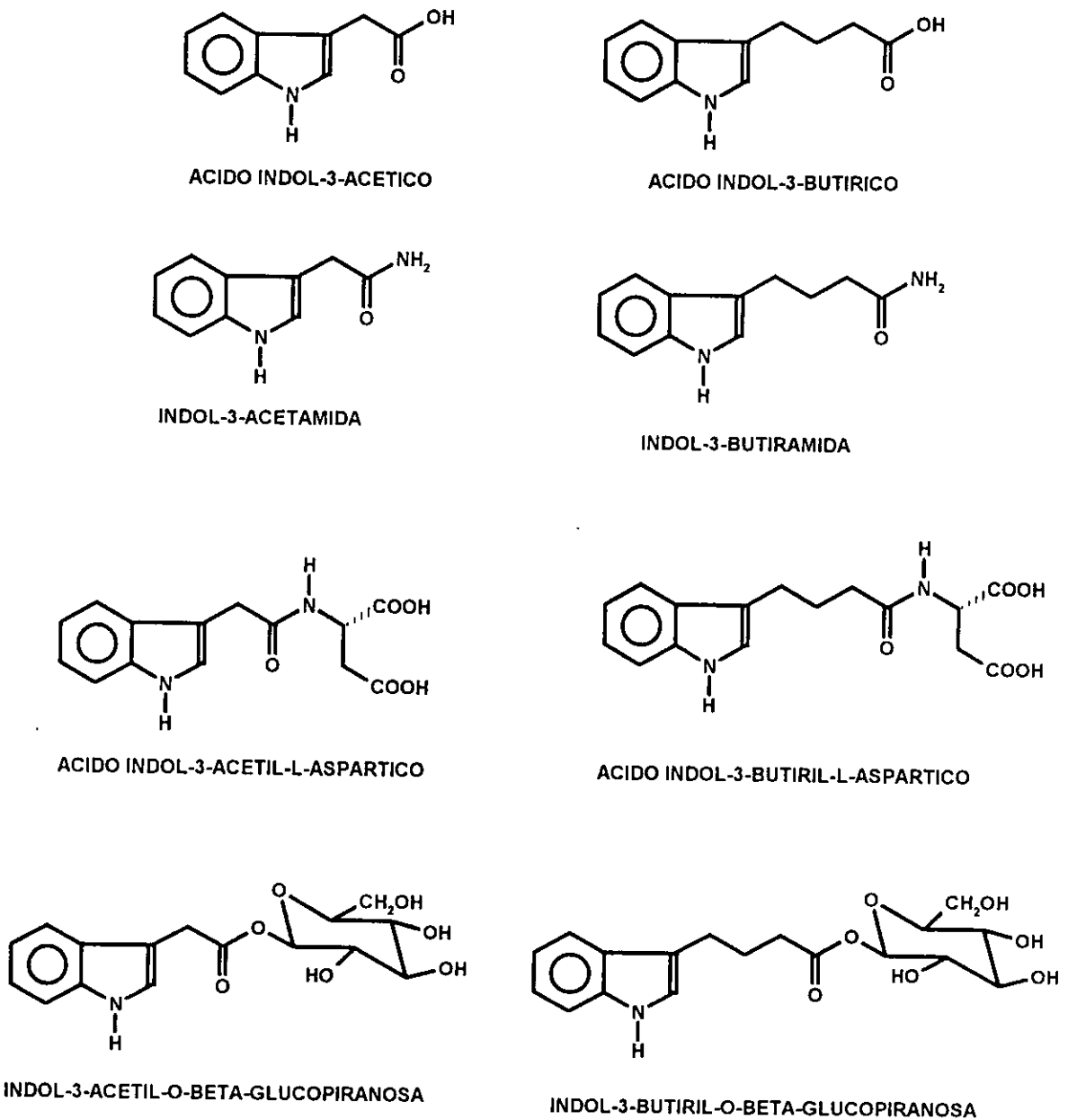


Figura 9. Se muestra la estructura de las auxinas naturales más importantes y sus derivados conjugados (tomado de Kefeli, 1978).

La conjugación también puede jugar un papel en el catabolismo del AIA en algunas especies, como lo han establecido Tuominen et al (1994), al demostrar la conversión del conjugado indolacetilaspártato (AIA-asp) en oxindolacetil aspártato y oxindolacetato, en híbridos de *Populus*; Monteiro et al (1988), quienes demuestran que el AIA-asp puede sufrir una oxidación para formar 2-indolona-3-acetilaspártato y Pluss et al, (1989), quienes reportan que primero se puede formar 2-indolona-3-acetato y posteriormente conjugarse para dar 2-indolona-3-aspártato. Finalmente, se ha notado que el conjugado que se forma puede llegar a oxidarse en la posición 7 para formar el glucósido del conjugado (Nonhebel et al, 1985). Las vías antes señaladas se ilustran en la figura 10.

Bialek y Cohen (1992) presentan evidencia que permite suponer que los conjugados tipo amida del ácido indolacético podrían controlar los niveles de AIA en la germinación de plántulas de *Phaseolus vulgaris*, a partir de la observación que los niveles de conjugados disminuyen rápidamente en los cotiledones durante la hidratación y que la disminución en los cotiledones se acompaña de un incremento en el AIA libre y amidado en el eje embrionario. Pero más allá de esto, se encuentra evidencia de que el eje embrionario sintetiza conjugados del AIA, sugiriendo un rol más amplio para los conjugados, que el representar un simple reservorio de AIA. Por su parte, Sasaki et al (1992) encuentran evidencia que sugiere que la formación de conjugados del AIA en zanahoria es regulada por los niveles endógenos de AIA libre y que esta regulación está asociada a la transcripción. Por otra parte, el AIA exógeno, disminuye los niveles de AIA activo, a través de un aumento en la conjugación de la auxina libre y la inhibición por retroalimentación de la biosíntesis de AIA (Ribnicky et al, 1996).



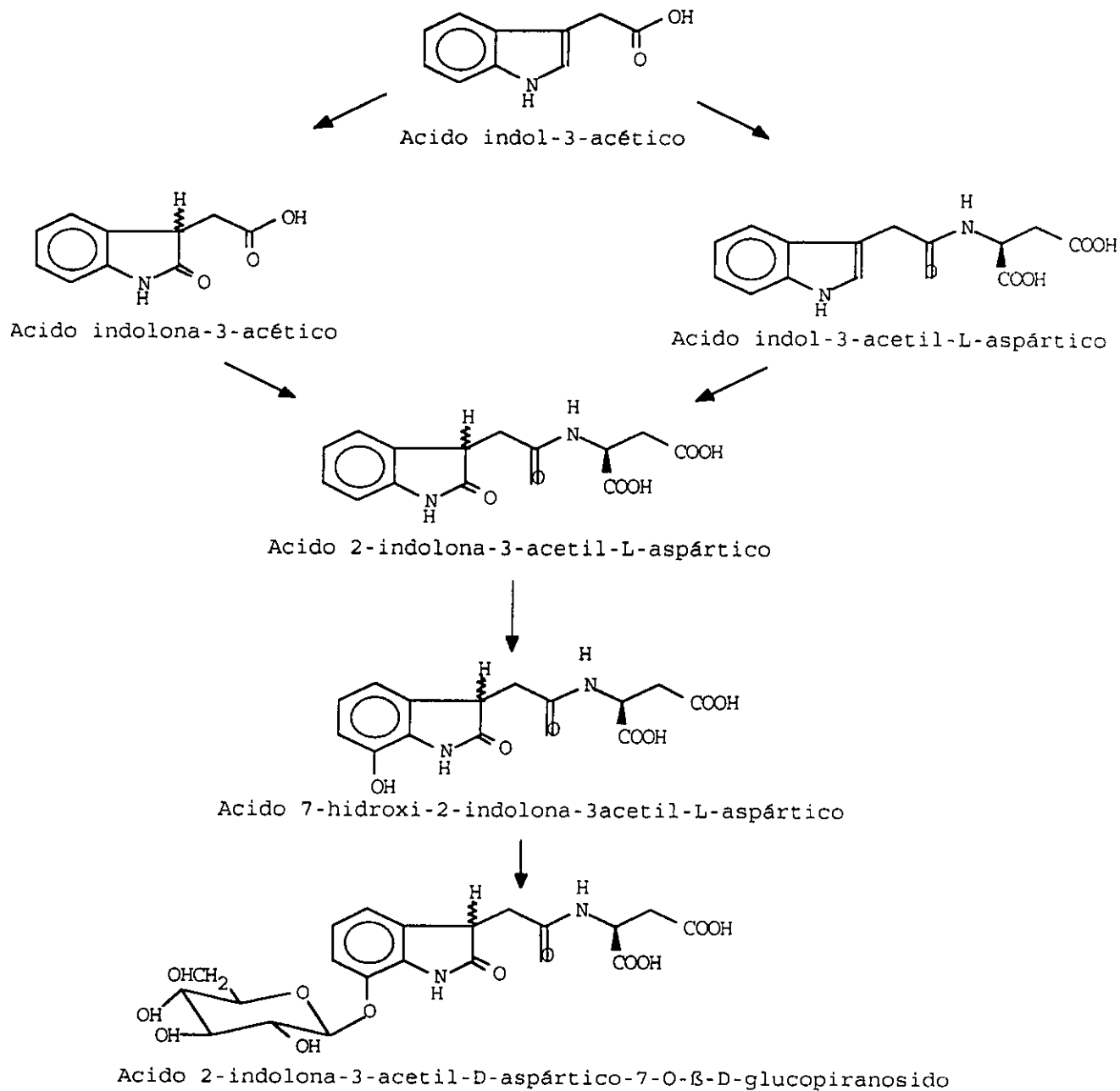


Figura 10.. Se muestran las reacciones que conducen a la oxidación del AIA, destacándose la participación de derivados conjugados, tanto de la auxina libre como de sus productos de oxidación. El esquema se ha elaborado tomando en consideración los reportes de Mollan et al (1972); Monteiro et al (1988); Pluss et al, (1989) y Nonhebel, 1985).

Winter y Thimann (1966) sostienen que el AIA aplicado exógenamente acelera el crecimiento de coleótilos, sólo si permanece en estado libre, ya que tan pronto se conjuga,

termina la estimulación del crecimiento, más recientemente, Hangarter y Good (1980) y Bialek et al (1983) muestran que los conjugados son biológicamente inactivos y que hasta que son hidrolizados por enzimas de las plantas, demuestran actividad auxínica. Dada esta última situación, los tratamientos con conjugados al parecer permiten una mayor resistencia a la oxidación de las auxinas, por lo que puede entenderse que los conjugados del AIA (Haissig, 1986) y del AIB (Wiesman et al, 1989) sean más efectivos para promover la formación de raíces adventicias en comparación con el ácido libre, puesto que representan una fuente de auxina que permite su liberación paulatina.

De acuerdo con Ludwig-Müller y Epstein (1991), el AIA se transforma en AIB mediante la intervención de acetil-CoA, por vía de una acetil-CoA sintetasa y de una acil-CoA transferasa. El AIB, al igual que el AIA puede conjugarse con ácido aspártico, y con un péptido en *Phaseolus aureus* (Wiesman et al, 1989) y también es oxidado, de forma similar al AIA (Wiesman et al, 1988; Epstein y Ludwig-Müller, 1993).

### **El mecanismo de acción de las auxinas**

Existen diversas hipótesis y sugerencias que intentan explicar la participación de diferentes elementos en el proceso de formación de raíces adventicias, sin que a la fecha se tenga una explicación de los eventos a nivel molecular que son inducidos por la auxinas (Abel y Theologis, 1996). Entre ellas podemos reunir las siguientes:

En los últimos años, muchos grupos han demostrado que el AIA induce rápidamente la transcripción de genes específicos en sistemas que responden por alargamiento celular o por división celular (Abel y Theologis, 1996; Napier y Venis, 1995; Key, 1989). Mennes et al (1992) reportan que el tratamiento con 2, 4-D en cultivos de células en suspensión de tabaco privadas de auxina, resulta en una acumulación significativa de 7 especies diferentes de RNA mensajero dentro de un intervalo de 15 a 30 min. Muchos de los cambios inducidos por auxinas se detectan sólo después de períodos largos y persisten por muchas horas, particularmente en tejidos que se dividen, mientras que otros suceden en lapsos temporales cortos (durante los primeros 20 min después de su aplicación) (Napier y Venis, 1995). El evento más rápido que inducen las auxinas es la hiperpolarización del protoplasto que es lograda entre el tiempo cero y los 2 minutos después de adicionar AIA (Napier, 1995); se cree que este proceso es mediado por la ABP1 (Auxin Binding Protein 1). En el transcurso de los primeros 20 min, se transcriben varios genes (los genes SAUR, ARG1, ARG2, GH3, pIAA4, pIAA5, pCNT103, pJCW2, parA, parB, pIAA6). Entre los 4 y los 6 min, se acidifica el citosol y se eleva el  $Ca^{2+}$  en este mismo compartimento, entre los 6 y los 8 min, se hiperpolariza la célula, entre los 8 y los 12 min se incrementa la  $H^+$ -ATPasa de membrana, se incrementa la velocidad de respiración e inicia la acidificación de la pared celular, y hacia los 13 min, inicia el crecimiento por alargamiento (Napier, 1995). En diversos estudios se ha encontrado que los productos de la expresión de los genes activados por auxinas son miembros de la superfamilia de las glutatión-S-transferasas, esta familia se ha relacionado con la protección de las sustancias endógenas contra los efectos adversos de las reacciones de oxidación (Abel y Theologis, 1996).

En reportes recientes, se ha encontrado que como resultado de la aplicación de auxinas, la inducción de ciertos genes lleva a aumentar el contenido de RNAm entre los 5 y los 60 min, y esta respuesta no requiere síntesis *de novo* de proteínas, por lo que se sugiere que es promovida directamente por el AIA (Abel y Theologis, 1996). También se han encontrado RNAs mensajeros derivados de la expresión de los genes SAUR (small auxin up RNA), que son específicamente inducidos por auxinas en 2 a 5 minutos (Guilfoyle et al, 1993, Li et al, 1994), pero la aplicación de inhibidores de la síntesis proteica estimulan la expresión de los genes SAUR, y la presencia de auxinas y de cicloheximida, superinduce la transcripción de los mismos (Abel y Theologis, 1996).

En otros casos, además del aumento de RNAs mensajeros, se ha demostrado un incremento en el contenido de proteínas. Oliver et al (1994) encontraron que la escisión del sistema de raíces del girasol (*Helianthus annuus*), resulta en la iniciación y formación de primordios de raíces adventicias, observándose que un total de 60 proteínas se sintetizan como resultado de la eliminación de la raíz, 50 de las cuáles son nuevas y 7 de ellas pueden ser tentativamente adscritas al proceso de formación de raíces adventicias. El análisis de los transcritos mediante síntesis proteica *in vitro* demuestra que al menos en parte, se tiene un cambio cualitativo en las reservas de RNAs traducibles.

En la figura 11 se muestra un esquema que resume algunas propuestas que se han sugerido para el mecanismo de acción de las auxinas. Por una parte, las auxinas pueden

entrar a la célula y activar en el núcleo la transcripción y la modificación postranscripcional, de tal manera que se promueva la síntesis de  $H^+$ -ATPasa en el retículo endoplásmico, se incorporen las vesículas que la contienen en el aparato de Golgi y se asocien a la membrana plasmática, para incrementar el bombeo de protones hacia el apoplasto. También se muestra la interacción de las auxinas con receptores a nivel de membrana plasmática, que interactúan con la fosfolipasa B2, que promueve la formación de lisofosfatidil colina, que a su vez promueve la actividad de una proteínkinasa que fosforila a las  $H^+$ -ATPasas, para activar el bombeo. En ciertas especies, se ha reportado la existencia de un sistema turbo, que bombea protones mediante la actividad de una cadena transportadora de electrones que probablemente utilice NADH como sustrato y que también es promovido por auxinas (Napier y Venis, 1995). Muy recientemente se han encontrado evidencias que pueden estar en contra de este modelo, particularmente, se reporta que no se incrementa el contenido de  $H^+$ -ATPasas de membrana y tampoco se evidencia un aumento en su actividad en membranas aisladas, como resultado del tratamiento con AIA (Jahn et al, 1996).

Probablemente una de las aproximaciones más relevantes para comprender el mecanismo de acción de las auxinas en la rizogénesis consiste en investigar por qué el AIB es más efectivo en la promoción rizogénica que el AIA. Hasta ahora se han proporcionado diversas explicaciones en relación al efecto diferencial entre estas auxinas, sin que se cuente con suficientes experimentos que demuestren si estas hipótesis tienen validez. Epstein y Ludwig-Muller (1993) resumen las causas de la mayor actividad del AIB así:

- 1) El AIB es más estable en solución (Nordstrom et al, 1991).

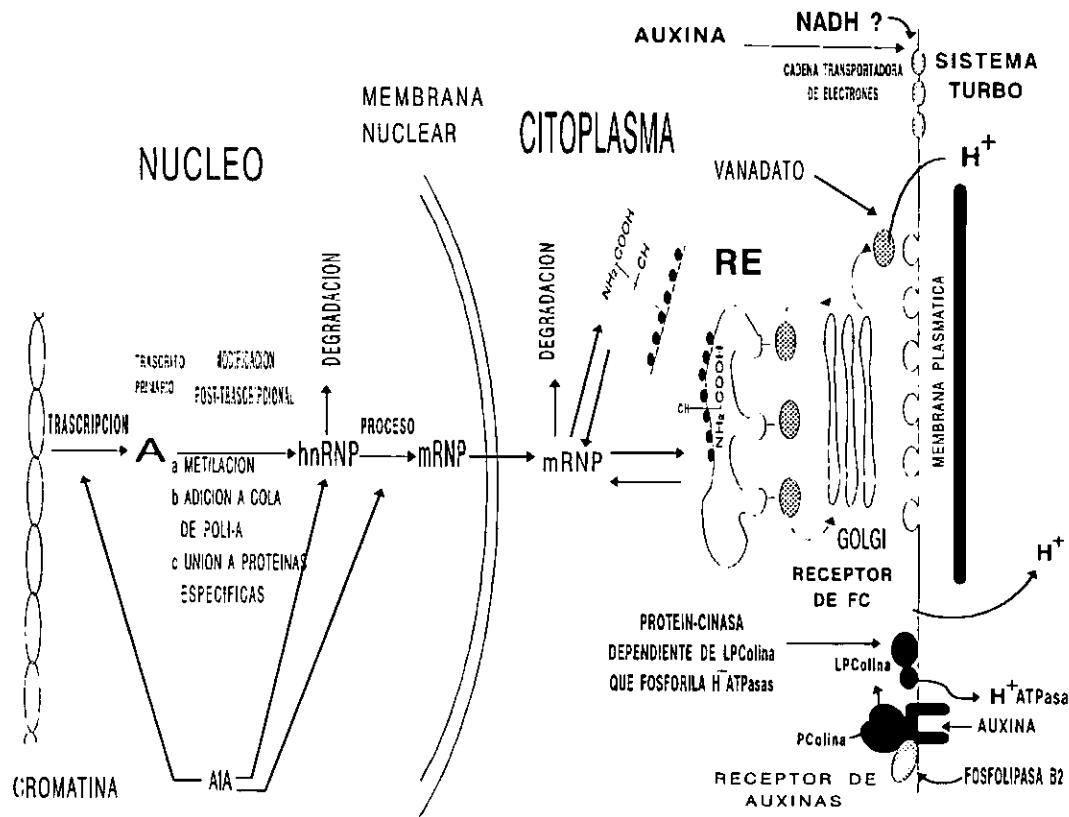


Figura 11. Mecanismo sugerido de acción de las auxinas. Se muestran los efectos que en diferentes niveles puede ejercer el AIA en la regulación de la expresión génica, para aumentar la concentración de  $H^+$  en el apoplasto. Se señalan interacciones a nivel de transcripción, procesamiento de ARNs heterogéneos nucleares y modificación post-transcripcional del ARN. Como resultado de ello, se aumentaría la síntesis proteica asociada al retículo endoplásmico (RE), que incrementaría la incorporación de proteínas de membrana plasmática involucradas con el bombeo de  $H^+$ . Adicionalmente, se muestra el efecto de las auxinas sobre la fosfolipasa  $B_2$ , la liberación de lisofosfatidilcolina, la fosforilación de la  $H^+$ -ATPasa y el bombeo de protones. Tomado de Theologis, 1986 y modificado de acuerdo a Napier y Venis (1995), Luthen y Böttger (1993) y Scherer y Andre (1993).

2) La capacidad para enraizar depende de la síntesis de AIA a partir de AIB y debe mantenerse una proporción de AIA/AIB determinada.

3) La capacidad para enraizar depende de la estabilidad de los conjugados de auxina respectivos, siendo más estables los conjugados de AIB (Merckelbach et al, 1991). Estos

autores reportan que el AIB se conjuga rápidamente en *Populus tremula*, y se mantiene elevado por más tiempo que el AIA.

4) La capacidad para enraizar depende de la habilidad del tejido para convertir el conjugado auxínico a la hormona libre durante una fase crítica del enraizamiento.

5) La incorporación y el transporte de las 2 auxinas difiere significativamente De acuerdo con estudios de Epstein et al (1993) y de Ludwig-Müller y Epstein (1993), citados por Epstein y Ludwig-Müller (1993), el AIB se incorpora más rápidamente.

Hasta ahora no se ha demostrado si el AIB es capaz de ejercer un efecto directo y más potente que el del AIA, tampoco se ha encontrado que las enzimas que hidrolicen los conjugados para producir auxinas libres se eleven en las fases críticas del enraizamiento y que presenten mayor afinidad por los conjugados de AIA, que las enzimas con actividad oxidativa de las auxinas descompongan con más facilidad al AIA, o que la afinidad del AIB hacia los posibles receptores sea mayor.

El sistema más estudiado para proporcionar ideas acerca del mecanismo de acción de las auxinas es el del alargamiento de coleóptilos. Rayle y Cleland (1979, 1992) han propuesto para explicar el alargamiento inducido por auxinas la teoría del crecimiento por acidificación, que supone que las auxinas estimulan la expulsión de protones hacia el apoplasto, provocando este proceso el reblandecimiento de la pared celular, como un evento necesario para que las células se alarguen.

La teoría del crecimiento por acidificación predice que una solución con pH (4.5 a 5) idéntico al del apoplasto de tejidos tratados con auxinas debería inducir el alargamiento a una velocidad comparable a la obtenida con auxinas. En experimentos desarrollados por el grupo de Cleland en 3 laboratorios se produjo un alargamiento 3 veces más rápido a pH 5 que a pH 6 ó 6.5 en segmentos de coleoptilo de avena, chícharo y maíz y la tasa de alargamiento fue comparable a la provocada por auxinas (Cleland et al, 1991). Arif y Newman (1993) encuentran que el AIA 10  $\mu\text{M}$  causa un flujo de protones que provoca un aumento a 15  $\text{nmoles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a partir de un flujo normal de 10  $\text{nmoles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La fusicoccina (que promueve la acidificación del apoplasto) provocó un alargamiento de 60-75% con respecto a la que es inducida por el AIA (10  $\mu\text{M}$ ), sugiriéndose que esta acidez inducida haría una contribución principal al crecimiento provocado por auxinas (Cleland, 1994).

Se ha cuestionado la validez de la teoría del crecimiento ácido inducido por auxinas, en tanto que se deben remover las capas celulares más externas para obtener evidencia que la soporte, y que la epidermis es el tejido blanco para las auxinas, sin embargo, evidencias recientes sugieren que debe reevaluarse el papel de la epidermis puesto que se ha demostrado que ésta no es el único tejido blanco para el alargamiento inducido por auxinas (Peterson, Richter y Felle, 1992).

Se había carecido de evidencia concluyente que indicara que el AIA primeramente reduce el pH de la pared celular, hasta el estudio reportado por Arif y Newman (1993), en el que midiendo flujo iónico con un microelectrodo en coleoptilos de *Avena sativa*, se detecta



un flujo normal de protones de  $10 \text{ nmoles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y cero flujo de calcio. La fusicoccina (1 mM) provoca un eflujo inmediato no sólo de protones sino también de calcio de aproximadamente  $110 \text{ nmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en cada caso. También hiperpolariza la membrana de -65 mV a -135 mV y así permanece por 30 min. Se interpreta en este estudio que la fusicoccina causa la extrusión de  $\text{H}^+$  del citoplasma, que se intercambia desplazando al  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a la pared celular. La aplicación de AIA  $10 \mu\text{M}$  causa un incremento transitorio de eflujo de  $\text{H}^+$  en cerca de  $15 \text{ nmoles.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (de  $5 \text{ nmoles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a  $19 \text{ nmoles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) con una fase de retraso de aproximadamente 10 min. Se reconoce esta fase, por despolarizarse la membrana en 7-10 min seguida de hiperpolarización en los próximos 20 min. La aplicación de AIA decreta el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $20 \text{ nmoles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a cero en 10 min. Se argumenta que este eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0.2 \text{ mmoles m}^{-2}$  en 40 min) debe provenir en su mayor parte de la pared celular y que su liberación de la pared podría ser explicada por el modelo de los ácidos débiles de Donnan-Manning para el intercambio de iones en paredes celulares (Richter y Dainty, 1990) que postula lo siguiente: En las paredes celulares de las células vegetales, las células están interconectadas por una matriz de materiales no celulósicos, que contienen ácidos urónicos de hemicelulosa y polímeros de pectina, aminoácidos de glicoproteínas y aún fenoles de las ligninas. Así, las paredes celulares pueden ser consideradas como un sistema de polímeros de ácidos débiles. A cualquier pH de las paredes ( $\text{pH}_w$ ), una proporción de los polímeros de la pared estarán protonados. Los ácidos débiles disociados remanentes de los polímeros de la pared actúan como polianiones. De acuerdo con Manning (1969), cuando la densidad de carga lineal a lo largo de los polímeros es mayor que el de un valor crítico, los iones de carga contraria (los cationes) con la mayor valencia pueden quedar

unidos electrostáticamente a los polianiones. El modelo de ácidos débiles de Donnan Manning extiende el modelo básico de Donnan de tal manera que además del espacio libre de agua y del espacio libre de Donnan, hay un espacio de condensación para los iones. En las paredes celulares, el  $\text{Ca}^{2+}$  es el principal catión de mayor valencia ( $z_i = 2$ ). Por lo tanto bajo estas condiciones, parte del calcio estará en el espacio de condensación, la mayoría del  $\text{Ca}^{2+}$  restante se encontraría en el espacio libre de Donnan con una pequeña cantidad en el espacio libre acuoso (figura 12). Sentenac y Grignon (1981) señalan que los protones pueden reemplazar al calcio asociado a los ácidos urónicos y en vista de ello, la acidificación de la pared puede resultar en el reblandecimiento de la misma, por la ruptura de puentes de calcio entre ácidos urónicos en las pectinas de pared. Por otra parte, Mizuno y Katou (1992), presentan evidencia que indica que la excreción de protones por la membrana plasmática que limita al simplasto del parénquima con respecto al apoplasto del xilema en *Vigna unguiculata*, es promovida por el AIA y la adición de sales de calcio, potasio y magnesio intensifican la acidificación del apoplasto, en vista de que estos cationes son intercambiados en la pared celular, reduciendo la capacidad para retener protones por parte de esta estructura; tal vez por causa de este intercambio, el  $\text{K}^+$  sea capaz de promover la formación de raíces adventicias en algunas plantas (segmentos de *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus aureus*, y cotiledones de *Cucumis sativus*) por la adición de KCl en concentraciones milimolares, observándose además, que el efecto del KCl sobre lotes tratados con AIA fue aproximadamente aditivo Zhao et al (1991); aunque el crecimiento de coleoptilos de *Zea mais* inducido por auxinas ha probado ser fuertemente inhibido por KCl

1mM o a concentraciones mayores, sin que haya hasta ahora una explicación para este efecto (Cleland, 1991).

Otro punto de vista es el que proponen Maruyama y Boyer (1994) quienes concluyen que la auxina actúa principalmente en el metabolismo de las paredes celulares, manifestándose esta actividad con un cambio en la velocidad de crecimiento y en la turgencia. Yamamoto (1994) sugiere que las auxinas estimulan el alargamiento a través de la formación de insaturaciones en los ácidos grasos de la membrana, en vista del descubrimiento del producto de la expresión del gene regulado por auxinas (ARG1) que es una desaturasa.

#### **Otras sustancias relacionadas con la formación de raíces adventicias.**

Se han encontrado diversas sustancias que potencian la actividad promotora de las auxinas en la formación de raíces adventicias. Entre ellas, resaltan los carbohidratos, las vitaminas, las poliaminas y los compuestos fenólicos (Weaver, 1972; Jarvis, Yasmin y Coleman, 1985, Hausman, Kevers y Gaspar, 1995).

#### **Compuestos Fenólicos**

Varios compuestos fenólicos son sinergistas de las auxinas, promoviendo tanto el alargamiento de tallos como la formación de raíces laterales (Weaver, 1972; Jones, 1976; Hegedus y Phan, 1983; Hartman y Kester, 1983; Jarvis, 1986). Balasimha y Subramonian (1983) encontraron un marcado efecto sinérgico sobre la formación de raíces adventicias

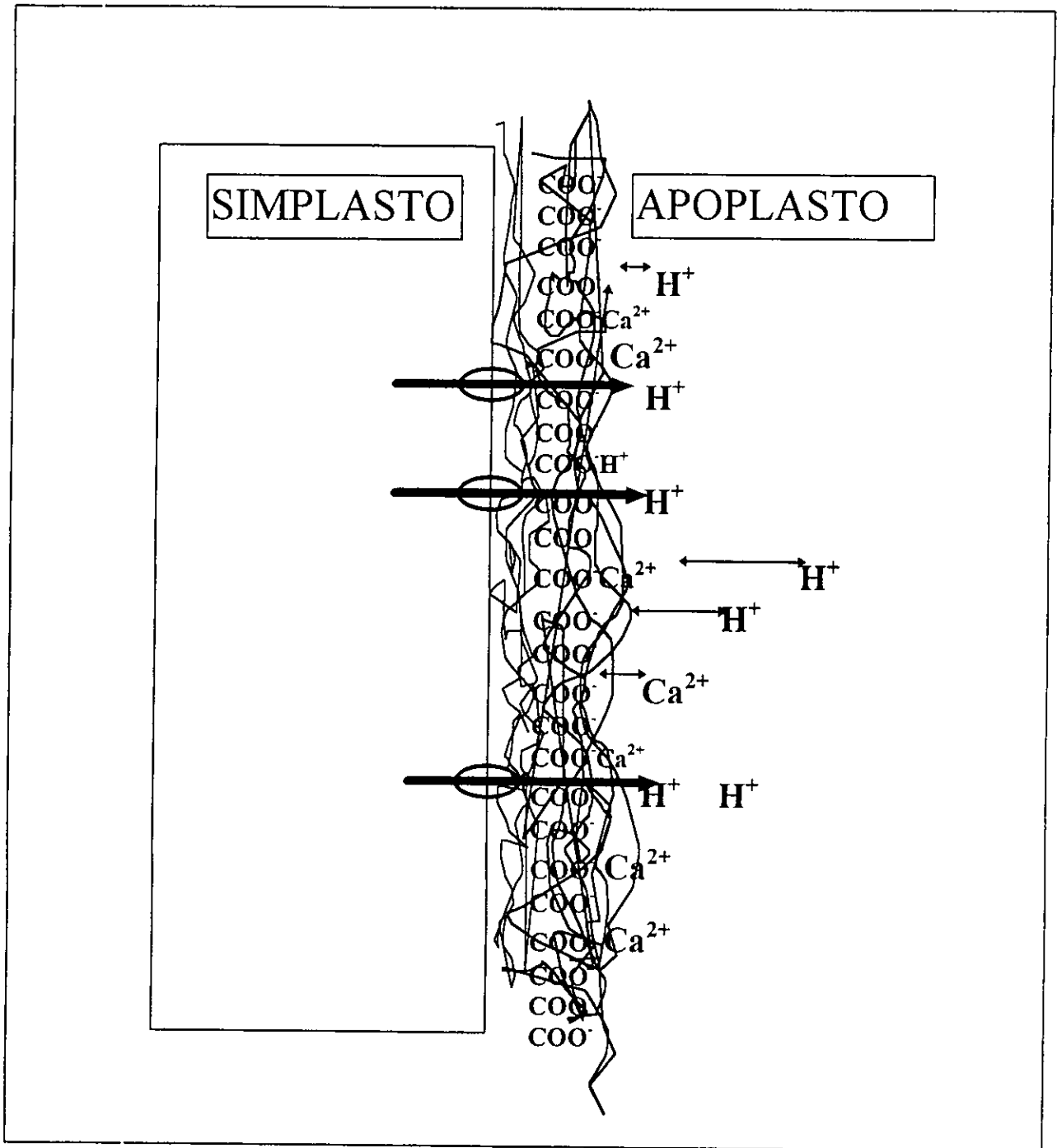


FIGURA 12. Se representan el simplasto, y el apoplasto, se ilustra la pared celular con cargas negativas derivadas de los ácidos urónicos de las hemicelulosas. El  $\text{Ca}^{2+}$  que normalmente está asociado estos polianiones, puede ser desplazado por efecto de la acidificación promovida por las  $\text{H}^+$  ATPasas de membrana.

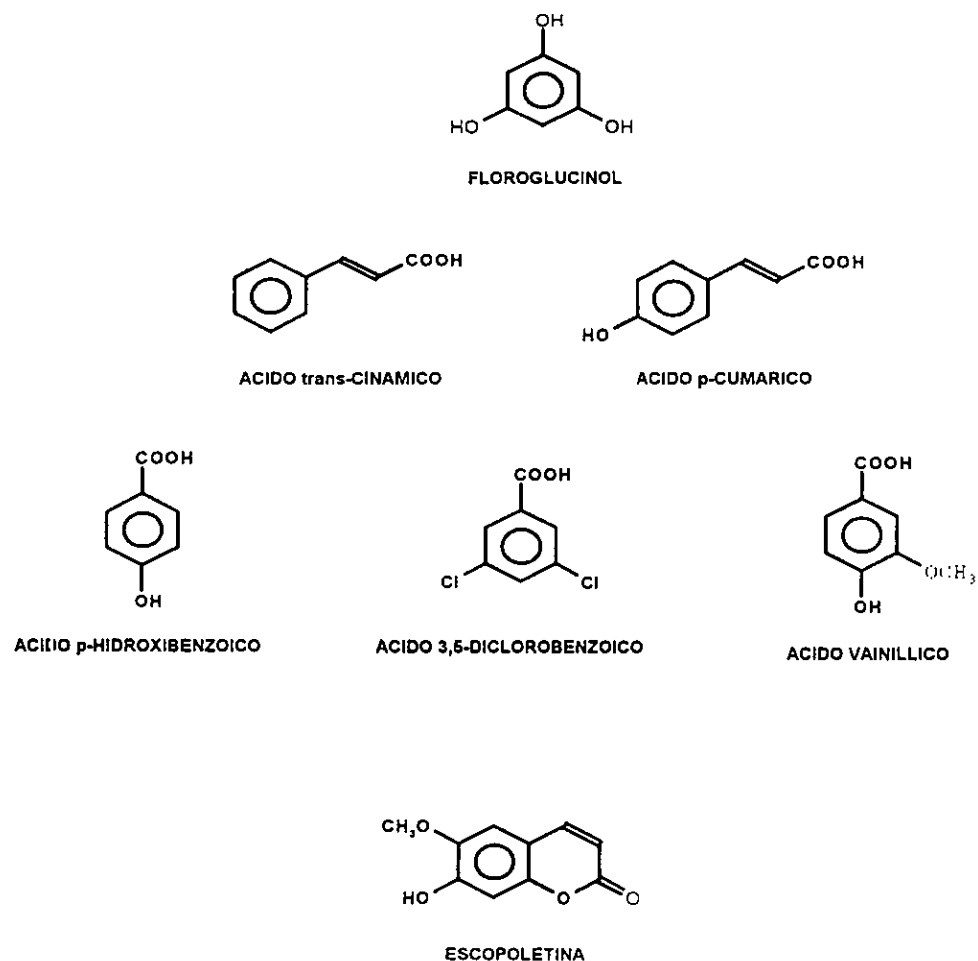
provocado por el ácido p-hidroxibenzoico en segmentos de tallo de cacao. Gesto et al (1977) encontraron que 2 fracciones obtenidas de *Salix viminalis* tuvieron efectos sinérgicos sobre la promoción del enraizamiento en frijol. Una de ellas tuvo efectos sin la adición de AIA, encontrándose que contenía una gran cantidad de catecol. James y Thurbon (1981b) reportaron que el floroglucinol (FG) actúa como sinérgico de auxinas en el rango de concentraciones de 16.2 a 1620 mg/l en la variedad de *Malus pumila* M.9. La combinación más favorable aplicada a cultivo de tejidos fue de 3 mg/l de AIB y 1620 mg/l de FG. Mi grupo de trabajo también ha encontrado que el FG tiene una actividad promotora en la formación de raíces adventicias en segmentos de *Phaseolus aureus* (resultados no publicados). Riov y Yang (1989) reportaron que la habilidad de los ácidos 3,5-dihidroxifenólicos para estimular el enraizamiento en segmentos de frijol mungo fue similar a su actividad biológica en otros sistemas vegetales. Basu y colaboradores (1969) reportaron que los ácidos fenólicos promovieron la actividad del AIA hasta 3 veces, a concentraciones de 1 a 1000 mg/l. Larqué-Saavedra y Reyes (1988) reportaron que el ácido acetilsalicílico estimuló la formación de raíces adventicias en *Phaseolus vulgaris*.

Una aproximación más hacia la comprensión de la importancia de los compuestos fenólicos en el enraizamiento ha sido la búsqueda de una correlación entre niveles endógenos y la dificultad del enraizamiento. Méndez y colaboradores han aislado ácidos fenólicos a partir de estacas de especies leñosas (*Salix*, *Quercus*, *Juglans*) y han estimado su contenido en plantas de fácil y difícil enraizamiento. Se ha encontrado que las especies difíciles de

enraizar (*Quercus robur* y *Fraxinus excelsior*) contienen mucha escopoletina (figura 13) que interfiere con la formación de raíces (Méndez et al, 1968). El ácido p-coumárico (figura 13) está presente en las 6 especies de fácil enraizamiento mientras que está ausente en 4 especies de difícil enraizamiento.

Los ácidos p-hidroxibenzoico y trans cinámico (figura 13) influyen positivamente en combinación con el AIA en el proceso de iniciación de raíces a concentraciones de 10-150 mg/ , pero a concentraciones de 200 mg/l o mayores producen una fuerte acción inhibitoria (Keřeli y Kadirov, 1971).

Se ha interpretado que estos compuestos funcionan como inhibidores de la actividad de AIA oxidasa de peroxidasas (Lee et al, 1978; Lee et al, 1982), funcionando como agentes que mantienen el nivel endógeno de auxinas (García-Florenciano et al, 1990), o que desvían la degradación del AIA hacia la formación de derivados no oxindólicos (Grambow y Lagenbeck, 1983). Ferrer et al (1992) reportan que las isoflavonas aisladas de *Lupinus* inhiben la actividad de AIAox en concentraciones del orden de 19 y 40  $\mu\text{M}$  en 50 y 90% respectivamente, y que el gradiente de distribución de éstas a lo largo de los hipocotilos sugiere que la actividad de AIAox de las peroxidasas extracelulares es fuertemente regulada por inhibidores durante el desarrollo de las células vegetales. Sin embargo, también se ha encontrado una correlación entre un aumento en la actividad de peroxidasa y el tratamiento con auxinas y compuestos fenólicos, Balasimha y Subramonian (1983) reportan que la actividad de peroxidasa en cacao (*Theobroma cacao*) fue más alta en los tratamientos con



*Figura 13. Se muestran algunas fórmulas de compuestos fenólicos*

AIB y ácido p-hidroxibenzoico en esta etapa y el número de isoperoxidasas también fue mayor. También se ha reportado que los fenoles disminuyen la formación de radicales peróxido (Larson, 1988) o que funcionan como trampas de radicales libres R' que participan en la cadena de reacciones que llevan a la oxidación del AIA (Krylov et al, 1993) y que afectan la respiración mitocondrial (Nanda y Dhawan, 1976).

Ciertos compuestos fenólicos con actividad desacoplante como el DNP actúan como sinergistas de las auxinas en frijol Azuki (*Vigna angularis*) desprovisto de yemas (Mitsuashi-Kato y Shibaoka, 1981); en germinados de *Phaseolus vulgaris*, el DNP incrementa el número de raíces adventicias sin el suministro exógeno de auxinas, aunque los segmentos tratados poseían hojas y yemas, presentándose por tanto condiciones propicias para encontrar auxina endógena (Krull, 1968).

Se ha considerado que los compuestos fenólicos deben tener una disposición de grupos funcionales determinada para mostrar actividad, sugiriéndose que solamente son activos los ortodifenoles; sin embargo, los ácidos 3-5-dihalo-4-hidroxibenzoicos y el 2,4-dinitrofenol (DNP), los cuales no son ortodifenoles, promueven activamente la formación de raíces adventicias en segmentos de frijol mungo (*Phaseolus aureus*) (Riov y Yang, 1989). Estos resultados son inconsistentes con el requerimiento estructural definido por Hess: Un compuesto fenólico que posee grupos hidroxilo adyacentes o en posición *para*, estimula la formación de raíces laterales (Hess, 1969). Otros reportes cuestionan la significancia de este requerimiento estructural (Bose et al, 1972; Gorter, 1969; James y Thurbon, 1981a).

### Poliaminas

Las poliaminas han sido implicadas en diferentes respuestas morfogénicas incluyendo la embriogénesis somática (Feirer et al, 1984), el alargamiento celular (Lee y Lin, 1996), la formación de flores (Torrighiani et al, 1987) y la formación de raíces adventicias (Sankhla y Upadhyaya, 1988; Torrighiani et al, 1989; Hausman et al, 1995). Estudios sobre formación de raíces adventicias usando el bioensayo del frijol mungo establecieron una



estrecha correlación entre los niveles incrementados de poliaminas endógenas y la formación de raíces adventicias estimulada por auxinas (Friedman et al, 1982 y Jarvis et al, 1983). Altamura et al (1991) encuentran que los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas en *Nicotiana tabacum* deprimieron el proceso rizogénico. En hiedra inglesa (*Hedera helix*), la adición de ácido naftalenacético (ANA) estimula el enraizamiento en fase juvenil pero no en fase madura, mientras que la adición de putrescina, espermina o espermidina, con o sin ANA no estimula la formación de raíces, en cualquiera de las fases, aunque la fase madura contiene mayores niveles de putrescina (Geneve y Kester, 1991). Numerosos investigadores han sugerido que las poliaminas son capaces de modular la acción de las hormonas vegetales a través de un mecanismo fundamental común a todas las células vivientes (Altman, 1989). Rey et al (1994) reportan un fuerte efecto positivo de las poliaminas sobre el enraizamiento de microtallos de avellana (*Corylus avellana* L.) adultos cuando se administran en combinación con AIB. Más recientemente, Hausman et al (1995), encuentran que la putrescina promueve la formación de raíces adventicias en *Populus*, y también lo hace un inhibidor de la síntesis de espermidina (la ciclohexilamina), mientras que la adición de espermidina se opuso al efecto promotor del ANA.

### **Interacción hormonal y elementos de respuesta.**

La influencia de las hormonas vegetales sobre los niveles endógenos de otras hormonas es indicativa de la complejidad de la interacción hormonal en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Cuando uno aplica auxinas a tejidos vegetales *in vivo* o *in*

*in vitro*, la interpretación de los efectos debería tomar en cuenta la evidencia de que la incorporación, metabolismo, rango de efectos secundarios y la magnitud de los efectos directos de la hormona, son dependientes de la presencia de otras hormonas. Además cada uno de estos factores puede ser modificado por una variedad de parámetros ambientales. Se sabe que factores como la luz, la temperatura y el estrés de humedad modifican el balance hormonal de células de todos los tipos de órganos vegetales. Así, la respuesta de los tipos particulares de células es fuertemente influenciada por la historia reciente de exposición de la planta a parámetros ambientales (Evans, 1984).

La traducción de señales probablemente ocupa las actividades de la mayoría de las proteínas de las células vegetales. Las secuencias de traducción de señales empiezan con un receptor a la señal. La variación en el número y afinidad de receptores y su distribución puede alterar la sensibilidad celular y la sensibilidad cambia durante el desarrollo; la figura 14 ilustra cómo mediante el control de los niveles de auxina y la sensibilidad de los receptores se pueden controlar respuestas como el alargamiento celular. Adicionalmente, debe haber diferentes receptores para la misma señal, que generen una respuesta más compleja. Los receptores a la luz roja, a las auxinas y al calcio han sido bien caracterizados y aquellos que reciben la luz azul y el etileno no están muy lejos de serlo (Allan y Trewavas, 1994).

La H<sup>+</sup>ATPasa de membrana plasmática es una enzima clave en la respuesta de la célula vegetal a varios estímulos externos e internos y juega un papel importante en la expansión celular, iniciación de la división celular y en las respuestas de las células a la luz, a

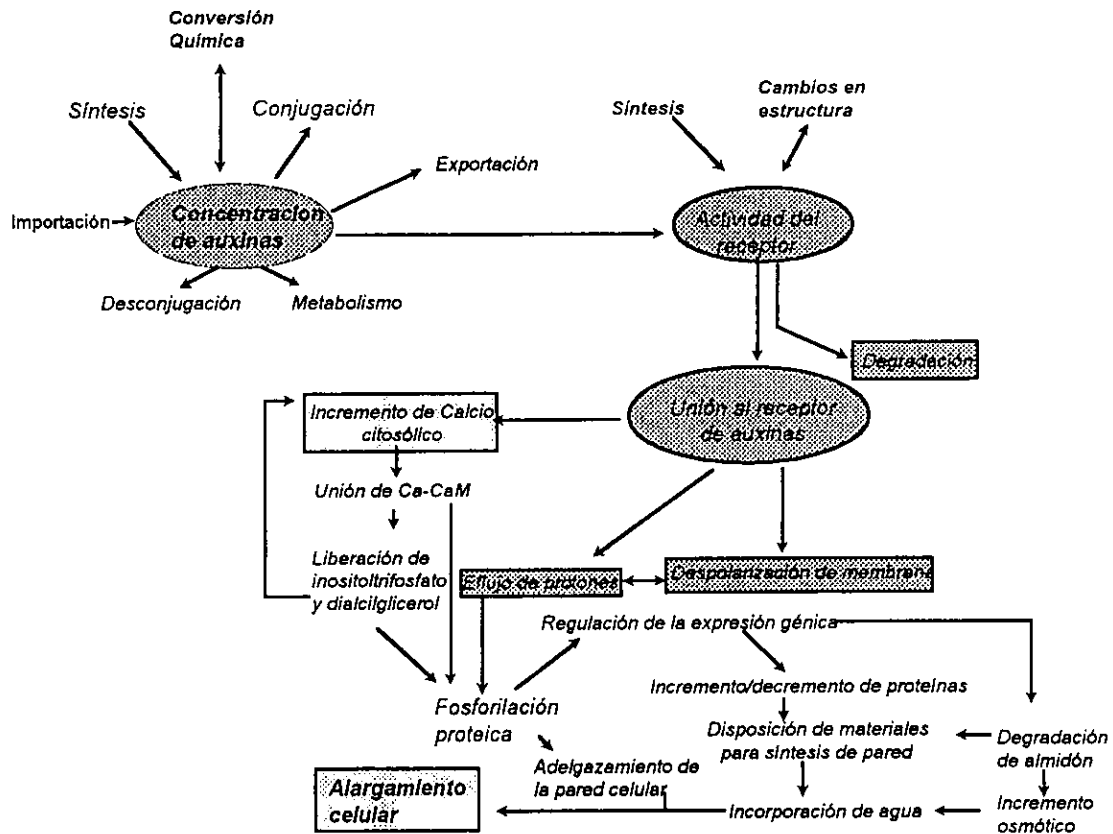


Figura 14. Se ilustra el control de los niveles y la sensibilidad de auxinas. Tomado de Brock, 1993. Se representan las diferentes vías que pueden controlar tanto los niveles de auxinas como la sensibilidad y concentración de los elementos de respuesta del sistema.

las fitohormonas, al estado nutricional y a las fitotoxinas (Serrano, 1989). Lanfermeijer y Prins (1994) reportan una considerable estimulación de esta enzima con fusicoccina, previamente al aislamiento de membrana plasmática. El pH óptimo de actividad es de 6.6, que permite un bombeo más activo cuando aumenta la concentración de  $H^+$  en el citosol (el pH normal es de 7.2 a 7.5), su  $K_m$  para el ATP oscila entre 0.3 y 1.4 mM y puede ser

inhibida específicamente con vanadato, dicitclohexilcarbodiimida, dietilstilbestrol y eritrosina B, pero no es inhibida por azida de sodio u oligomicina (que inhiben la H<sup>+</sup>ATPasa de mitocondria y cloroplasto, ni por nitrato (que inhibe la H<sup>+</sup>ATPasa de vacuola) ni por molibdato (que es un inhibidor no específico de fosfatasas) (Michelet y Boutry, 1995).

### **Citocininas, giberelinas y etileno**

Citocininas. El papel de las citocininas en la formación de raíces es un tópico que tiene más preguntas que respuestas. Más allá de esta situación, parece ser que las citocininas influyen en la movilización o en la protección de otras sustancias, más que en un papel directo sobre la formación de raíces adventicias, aunque el efecto que se logra al administrar una cierta proporción de auxinas y citocininas en la diferenciación de los tejidos indica claramente lo que aún ignoramos en cuanto a la relevancia que tienen en la organogénesis (Van Staden y Harty, 1987). En función del tejido que las produce, las citocininas deben jugar un papel crucial en las raíces, ya que las regiones apicales de éstas son uno de los sitios esenciales de su biosíntesis (Short y Torrey, 1972; Zavala y Brandon, 1983 y Chen et al, 1985).

Bourquin y Pilet (1990) concluyen que la aplicación de zeatina (la primera citocinina natural que se descubrió) inhibe el crecimiento de raíces mediante la modificación del nivel endógeno de AIA, de acuerdo a la sensibilidad inicial de las raíces hacia la citocinina, concordando con lo reportado por Nissen (1985 y 1988) y Guern (1987). Malik y Saxena

(1991) demuestran que el efecto de aplicar N-bencilaminopurina en el medio de cultivo de *Phaseolus vulgaris*, es el de incrementar 7 veces la regeneración de raíces.

Giberelinas. La inhibición de la formación de raíces por las giberelinas depende del tiempo de aplicación. Si éstas son aplicadas entre el día 0 y el 3-4, la respuesta típica será la inhibición del proceso. Las condiciones de iluminación pueden modificar el efecto de las giberelinas. Las auxinas generalmente disminuyen el efecto inhibitorio de las giberelinas (Hansen, 1987). Sebánek et al (1991) reportan que la aplicación combinada de paclobutrazol (inhibidor de la biosíntesis de giberelinas) y ácido indolacético en soluciones de inmersión, promueve significativamente la rizogénesis en segmentos de *Ligustrum vulgare*. Este efecto se correlaciona con un aumento en el nivel de AIA endógeno que se registra ante los tratamientos con paclobutrazol. Burkhart y Meyer (1991) reportan que los inhibidores de síntesis de giberelinas promueven el enraizamiento en pino blanco (*Pinus strobus*). Smith y Thorpe (1975b) encuentran que las giberelinas promueven el establecimiento de algunas fases en la diferenciación hacia raíces adventicias en *Pinus radiata*.

Etileno. El efecto del etileno sobre la formación de raíces adventicias es altamente variable dependiendo de la especie de planta y de las condiciones ambientales y fisiológicas. La promoción del enraizamiento se ha reportado más frecuentemente en plantas intactas, con respecto a su efecto en segmentos; más en herbáceas que en leñosas y más en las especies que tienen iniciales de raíces preformadas que en las que carecen de ellas. Aunque no existe consenso, la mayor parte de las evidencias sugieren que el etileno endógeno no está

directamente involucrado en el enraizamiento inducido por auxinas (Mudge, 1987), pero si se le atribuye un papel de aumento en la sensibilidad hacia las auxinas (Smalle y Van Der Straeten, 1997).

### **Los reguladores del crecimiento, el balance energético y la respiración.**

Los niveles de ATP se han podido estimar en algunas especies vegetales, reportándose para plantas superiores un rango de 5 a 200 nmoles/g de peso fresco (Pradet y Raymond, 1983). Aunque es escasa la literatura que sugiere la vinculación de los procesos bioenergéticos en la regulación de fenómenos como la diferenciación celular, tiene particular relevancia el efecto que provocan los reguladores del crecimiento sobre el metabolismo energético, por ejemplo Haissig (1990) reporta que los niveles de ATP en *Pinus banksiana* disminuyen en un 25% en los lotes tratados con la auxina N-fenil indolil-3-butiramida.

Las escasas citas que refieren algún efecto de los reguladores del crecimiento sobre la respiración se indican a continuación: Chauveau et al (1983) y Dizengremel et al (1982) reportan que la bencilaminopurina (BA) es un potente inhibidor del transporte electrónico resistente al cianuro en mitocondrias vegetales, reportándose en el último caso que el sitio de interacción es diferente del de otros inhibidores de esta vía tales como el ácido salicílico hidroxámico (SHAM). Además, Chauveau et al (1983) reportan que la BA tiene un segundo sitio de acción que es común al sitio de inhibición de la rotenona de la vía sensible al cianuro de mitocondrias de papa, al usar malato como sustrato oxidable.

Roussaux et al (1983) encuentran que no solamente las citocininas tienen este efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial, sino que los compuestos relacionados con auxinas: ácido triiodo benzoico (TIBA) y ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) inhiben tanto la oxidación del succinato como la del malato vía la malato deshidrogenasa. Ravel

(1986) ha reportado actividad desacoplante por parte de compuestos fenólicos como las flavonas y flavonoles sobre la fosforilación oxidativa en mitocondrias vegetales y Robert et al (1975) reportan la actividad desacoplante de la fosforilación oxidativa, del ácido 3,5-diiodo-4-hidroxibenzoico (DIHB) en berro (*Nasturtium officinale*).

Además de los reportes que evidencian la participación de los reguladores del crecimiento mencionados (citocininas y auxinas) en la alteración de la respiración mitocondrial, también se ha demostrado la participación de sustancias en la diferenciación celular, con capacidad probada para alterar los procesos energéticos como la fosforilación oxidativa. Nanda y Dhawan (1976) observan un incremento en la formación de raíces adventicias en segmentos de hipocotilos etiolados ante la aplicación exógena de 2, 4-dinitrofenol ( $2.72 \times 10^{-5}$  M), conocido desacoplante de la fosforilación oxidativa. Riov y Yang (1989) encuentran que el DIHB que es otro conocido desacoplante y nuevamente el 2,4 dinitrofenol (DNP), estimulan la formación de raíces en segmentos de frijol mungo (*P. aureus*). Los autores sugieren que el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos en la estimulación de la rizogénesis podría atribuirse a que se mantenga un alto nivel de AIA libre, como consecuencia de la disminución en la disponibilidad de ATP, que sería necesario para la conjugación del AIA. La interpretación anterior se fundamenta también en que los mismos autores encuentran que el DIHB inhibe la conjugación del AIA, y que el DNP (Lau et al, 1974) y otros compuestos fenólicos (Lee, 1980) también inhiben la conjugación. Por otra parte, de acuerdo a Robert et al (1976b), la descarboxilación del AIA es también inhibida por el DIHB. Sin embargo Riov y Yang (1989) sostienen que la interacción de los

compuestos fenólicos debe ser más compleja, ya que el tratamiento combinado de AIA con los fenoles desacoplantes debería llevar a una mejor respuesta rizogénica, sin que esta se haya obtenido en los experimentos que ellos realizaron., además de que el carbonilcianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP, que es otro desacoplante), no estimuló la formación de raíces.

### **Peroxidasas, AIA oxidasas y rizogénesis.**

Se han sugerido 3 hipótesis en relación con las isoenzimas involucradas en la oxidación del AIA. La primera considera que los 2 tipos de actividad (AIA oxidasa y peroxidasa) están presentes en enzimas distintas que además se pueden separar (Sequeira y Mineo, 1966 y Talwar et al, 1985). La segunda considera que los 2 tipos de actividad residen en una misma enzima (peroxidasa) pero con 2 sitios activos y la tercera señala que en un miembro de la familia de las isoenzimas de la peroxidasa, puede residir la actividad de oxidasa del AIA (Gaspar et al, 1982).

El control del nivel endógeno de auxinas es uno de los factores que más estrechamente se ha relacionado con la capacidad rizogénica de las especies hasta ahora estudiadas. Se ha atribuido un papel especialmente importante en este proceso de control a las peroxidasas. Estas son enzimas cuya función primaria es oxidar moléculas a expensas de peróxido de hidrógeno. Según lo refieren Gaspar et al (1982), a partir de 1918 se mostró que la actividad peroxidasa era ampliamente encontrada en plantas. Durante el período de 1918 a 1931 se purificó la enzima y su actividad fue registrada mediante la oxidación de pirogalol a purpurogalina. En 1931 se mostró que la peroxidasa era una hematina (Saunders



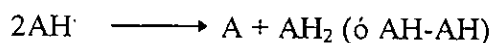
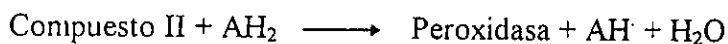
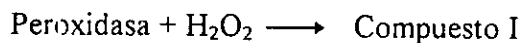
et al, 1964). Amako (1994) reporta que son muchos los sustratos sobre los que actúa el tipo más común de peroxidasa, que corresponde a la llamada Peroxidasa del Guaiacol y que este tipo de peroxidasa interviene en la biosíntesis de lignina (Polle et al, 1994) y en el desarrollo y organogénesis de las plantas vía la degradación del AIA o la biosíntesis de etileno. Este tipo de peroxidasa (peroxidasa de plantas superiores: donador:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidorreductasa EC 1.11.1.7) puede utilizar, como su nombre lo indica, una variedad de donadores para reducir al oxígeno que constituye al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Hace 50 años que se descubrieron las formas múltiples de las especies de peroxidasas separables por electroforesis (Clarkson et al, 1992). Tales isoenzimas se clasifican en formas catiónicas ó aniónicas, según se unan o no a la carboximetilcelulosa (Shannon et al, 1966). Las isoenzimas aniónicas y catiónicas del rábano (*Armoracia rusticana*) se distinguen entre sí por diferencias en la composición de aminoácidos y de carbohidratos, por su movilidad electroforética, su sensibilidad a inhibidores y diferentes Kms aparentes para sus sustratos (Kim y Kim, 1996).

La peroxidasa es probablemente la enzima que presenta mayor número de isoformas (cerca de 42 en el rábano) (Gaspar et al, 1982). Además de la oxidación peroxidativa de moléculas donadoras de electrones, varias reacciones son catalizadas por peroxidasa: oxidaciones aeróbicas, hidroxilaciones de moléculas aromáticas, formación de etileno y halogenaciones (Gaspar et al, 1982).

De acuerdo con Gaspar et al (1982), las peroxidasa s e isoperoxidasas se han purificado de diversas plantas y no parecen tener variación significativa en tamaño (de 40 a 50 KD), espectro de absorción o actividad. Sin embargo, van Huystee (1987) reporta pesos moleculares de 33 890 para la peroxidasa C (peroxidasa catiónica) de rábano y 31 060 para la peroxidasa de nabo. Las peroxidasa s constan de una glicoproteína incolora combinada a una ferriporfirina roja-parda (Gaspar et al, 1982) habiéndose observado en chícharo que en el primer día de un período de 4 días predomina la peroxidasa no glicosilada y al cuarto día la forma glicosilada (Darbyshire, 1973). Se ha confirmado la unión de calcio a 2 isoenzimas de la peroxidasa de *Armoracia rusticana*. El calcio contribuye a mantener la conformación estructural de la isoperoxidasa C. La peroxidasa C libre de calcio se reconstituye por la adición de este ion y recupera su actividad (Gaspar et al, 1982).

Las peroxidasa s de plantas forman con los peróxidos, generalmente tres tipos de compuestos llamados compuestos I, II y III, que tienen espectros de absorción característicos. Los compuestos I y II se forman solamente en presencia de baja concentración de peróxido. Las siguientes reacciones han sido confirmadas para la oxidación de moléculas donadoras catalizadas por peroxidasa:



Entre los mecanismos de reacción sugeridos para esta enzima destacan el de Yamazaki y colaboradores (Yamazaki et al, 1960), quienes proponen que se forman radicales libres derivados de las moléculas donadoras de electrones; otro modelo, contempla la actividad oxidativa de la peroxidasa en ausencia de peróxido proponiéndose también la formación de radicales libres (Klapper y Hackett, 1963). Apoyándose en este último modelo, Ricard y Nari (1967) han propuesto un mecanismo análogo para la oxidación del AIA que involucra la reducción de la ferriperoxidasa y la formación subsecuente de oxiferriperoxidasa. Fox et al (1965); Fox y Purves (1968); Kenten, (1955); Ray, (1956); Ray y Thimann, (1956); Morita et al, (1962) y Hinman y Lang, (1965), también han explicado la oxidación del AIA en ausencia de peróxido. A partir de estos trabajos, que a pesar de ser antiguos son vigentes, se considera que el producto dominante en concentraciones altas de enzima es el indol 3-aldehído, además se forma 3-metilenoxindol.

La enzima oxida  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  y el AIA es oxidado subsecuente en reacciones no catalizadas enzimáticamente a 3-metilenindolenina, que formaría tipos y cantidades de productos determinados por el pH y composición de la mezcla de reacción.

Una pequeña adición de peróxido de hidrógeno elimina la fase de retraso comúnmente observada en la oxidación no peroxidativa del AIA y promueve la oxidación del AIA que consume oxígeno bajo ciertas condiciones experimentales; la catalasa no inhibe esta oxidación en determinadas condiciones, aunque sí la reduce (Ray, 1958).

Consecuentemente, el papel del peróxido no parece ser esencial, aún como iniciador de la reacción; no obstante, Kokkinakis y Brooks (1979b) sostienen que el peróxido se requiere para iniciar la formación y acumulación de intermediarios. Talwar et al (1985), han obtenido fracciones con actividad de AIA oxidasa peroxidativa y no peroxidativa, a partir de una preparación enzimática cruda de frijol mungo. Se ha demostrado también utilizando superóxido dismutasa, que los aniones superóxido no están involucrados en esta oxidación del AIA, ya que esta oxidación no es inhibida al adicionar dicha enzima. El AIB y el AIP (ácido indolpropiónico) que parecen incapaces de reducir al peróxido, no son degradables en ausencia de esta sustancia. La imposibilidad de inhibir completamente la degradación del AIA con concentraciones altas de catalasa (lo suficientemente altas para inhibir completamente la peroxidación típica de AIB y AIP) no puede interpretarse sino como oxidación parcial del AIA sin requerimiento de peróxido (Gaspar et al, 1982). Es reforzada esta interpretación por el trabajo de Grambow y Lagenbeck Schwich(1983), quienes proponen la existencia de una ruta degradativa para el AIA sin la participación del peróxido de hidrógeno.

Las peroxidases juegan un papel clave en el proceso de formación de lignina (Gaspar et al, 1982; Baier et al, 1993). Se ha reportado también que las peroxidases asociadas a las paredes celulares de la raíz del rábano catalizaron la formación de  $H_2O_2$  en presencia de NADH con la ayuda de un sistema malato/oxalacetato de membrana plasmática. El  $H_2O_2$  producido podría emplearse en las reacciones de entrecruzamiento que llevan a las

glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (extensinas) a unirse iónicamente con los polisacáridos ácidos de la pared celular (Brownleader et al, 1993 y referencias ahí citadas).

Se ha demostrado que existen peroxidasas en pared celular y en sistemas membranosos endocelulares (Goldberg et al, 1986); y si bien algunas veces se ha reportado actividad en mitocondrias y cloroplastos, los estudios citoquímicos no confirman esta localización, sugiriéndose que la actividad encontrada sea el resultado de contaminación por otras fracciones celulares (Gaspar et al, 1982). La asociación de las isoperoxidasas a la pared celular se produce tanto por unión covalente como por interacciones iónicas (Ridge y Osborne, 1971). Más recientemente se ha reportado (Zheng y Van Huystee, 1992a) la localización en el citoplasma de hipocotilos de cacahuete de una peroxidasa aniónica que tiene mayor afinidad por el AIA y el ácido ascórbico en presencia de peróxido de hidrógeno que la peroxidasa catiónica de la pared celular aislada del mismo tejido. La peroxidasa catiónica demostró tener un papel importante en las funciones de la pared celular, incluyendo la oxidación de tirosina y feruloil-pentosanos, mientras que se considera que la peroxidasa aniónica citosólica desarrolle un papel importante en el sistema de defensa en contra del estrés peroxidativo y en el proceso de crecimiento.

La actividad de AIA oxidasa o peroxidasa es controlada por la relación síntesis/degradación de isoenzimas, por la presencia de sustancias que controlan la actividad en cada compartimento y por la transferencia de enzimas de un compartimento a otro.

Dentro de las sustancias que controlan la actividad de las peroxidasas se distinguen los compuestos fenólicos (Zheng y Van Huystee, 1992b), el calcio y otros iones. El calcio puede activar enzimas preexistentes, fijar a las peroxidasas a membranas determinadas o provocar su liberación hacia afuera de la célula por exocitosis (Gaspar et al, 1982).

Entre los procesos fisiológicos mediados por peroxidasas se encuentra la rizogénesis; para este proceso se consideran importantes los efectos que las peroxidasas tienen sobre el catabolismo de auxinas (Bansal y Nanda, 1981; García-Florenciano et al, 1991; Gaspar et al, 1982; Srivastava y van Huystee, 1977 y Valpuesta y Buckovac, 1983) y sobre la formación de lignina y biogénesis de la pared celular (Haard, 1977; Gaspar et al, 1985 y Bolwell, 1988).

La evidencia más común y directa para considerar involucradas a las peroxidasas en el catabolismo de auxinas ha sido la correlación entre la actividad de peroxidasa de un extracto, la capacidad del mismo para degradar AIA y el desarrollo del fenómeno fisiológico. Algunas veces se ha correlacionado el nivel endógeno de auxinas. Se tienen también evidencias más indirectas (Gaspar et al, 1982), que provienen de estudios sobre los efectos de la aplicación de efectores positivos ( $Mn^{+2}$ , fenoles monosustituídos) o negativos (polifenoles) (García-Florenciano et al, 1990), o de la variación endógena de algunos de estos efectores en relación a la fase particular del fenómeno fisiológico estudiado. Se ha reportado que la presencia de compuestos fenólicos puede determinar que se formen derivados oxindólicos o indólicos como productos de la actividad de peroxidasa (Grambow

y Lagenbeck-Schwich, 1983). Se han establecido correlaciones más definidas, a partir del descubrimiento de Mazza et al (1970) y Ricard y Job (1974) que las isoperoxidasas más básicas (catiónicas) tienen mayor capacidad para destruir al AIA *in vitro* a pH ácido y en ausencia de peróxido.

Endo (1968) reportó un método para caracterizar las isoformas de la AIAox, basado en la tinción de un intermediario no identificado de la degradación del AIA con una sal de diazonio para formar un complejo coloreado insoluble, con la cual se abrieron varias posibilidades para estudiar la posible participación de las peroxidasas en el control de los niveles de AIA endógeno y sus posibles consecuencias en el crecimiento y diferenciación de las células vegetales (Dencheva y Klisurska, 1982).

Mientras algunos investigadores asignan el papel de destoxificación a la oxidasa del AIA (Galston y Davies, 1969; García-Florenciano et al, 1990; Krylov et al, 1993), otros consideran que esta enzima forma productos de oxidación que son los causantes de las respuestas fisiológicas características de las auxinas (Basu y Tuli, 1972; Tuli y Moyed, 1969). Gurumurti, Chibbar y Nanda (1974) han encontrado que el metabisulfito de sodio actúa en sinergismo con el AIA, interpretándose que la activación producida por este compuesto sobre la oxidación del AIA catalizada enzimáticamente causó un incremento en la producción de raíces adventicias; por otro lado, se observó una completa supresión del enraizamiento en segmentos de hipocotilo de frijol mungo provocada por la aplicación de 100mg de un inhibidor proteico de la AIA oxidasa que fue aislado a partir de *Hipomoea*

*fistulosa*. El principal producto de oxidación del AIA (el metilenoindol) ha sido involucrado como el efector que interactúa a nivel genético para promover la expresión génica, probablemente a través de su capacidad para reaccionar con grupos SH de histonas ricas en arginina, que podría resultar en efectos regulatorios (Demorest y Stahman, 1972). Se ha discutido si las auxinas o sus derivados de oxidación ejercen la acción primaria sobre la rizogénesis, predominando los grupos que sostienen que son las auxinas (Blakesley, 1994; Bialek y Cohen, 1992; Davis et al, 1988; Thimann, 1977) y no sus productos de oxidación (Basu y Tuli, 1972; Tuli y Moyed, 1969; Demorest y Stahman, 1972), las sustancias activas.

#### **El Calcio sus efectos y su posible participación como segundo mensajero.**

La aplicación exógena de calcio estimula la formación de raíces laterales en hipocotilos de frijol mungo (Jarvis y Yasmin, 1985); en los tejidos vegetales, el ion calcio se encuentra presente en el citosol en concentraciones submicromolares y en compartimentos extracitosólicos en concentraciones milimolares y se considera que actúa como un segundo mensajero de señales externas que determinan cambios en las células (Hepler y Wayne, 1985), actuando como un elemento de acoplamiento estímulo-respuesta que conceptualmente implica que un estímulo fisiológico conduce a cambios en la velocidades de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  entre reservorios internos o externos y el citoplasma. El cambio resultante en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol representa la señal capaz de regular la actividad de las enzimas blanco respectivas y es así expresado como un efecto fisiológico (Kauss, 1987). Dos de los factores que determinan esta distribución asimétrica son el gradiente eléctrico a través de membranas biológicas y la actividad de ATPasas de membrana que transportan



calcio que están presentes en plasmalema y tonoplasto y probablemente en plástidos y en retículo endoplásmico (Terry et al, 1992). Aún cuando no había sido posible medir cambios en la  $[Ca^{2+}]$  citosólica, según lo reporta Kauss (1987), varias respuestas de las células vegetales ahora han mostrado involucrar cambios locales o globales en la concentración citosólica de calcio libre (Tester, 1990). Se han empleado microelectrodos sensibles, fotoproteínas y colorantes fluorescentes sensibles al calcio, llegándose a establecer por este medio los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico (Terry et al, 1992). Sin embargo, aún permanece la incertidumbre acerca de las fuentes de los iones calcio responsables de la elevación de la concentración citosólica. Se mantiene una concentración de  $0.1 \mu M$  gracias al transporte a través de diferentes sistemas membranales que incluyen el tonoplasto, el retículo endoplásmico, las envolturas de los plástidos y mitocondrias y la membrana plasmática.

Los canales permeables a los iones calcio en cualquiera de estas membranas pueden ser disparados para provocar un rápido incremento en la concentración citosólica de iones calcio (Terry et al, 1992). En células internodales de *Chara* se encuentra un influjo que oscila entre  $0.2$  y  $0.7 \text{ nmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , el cuál se incrementa a  $2 \text{ nmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en soluciones con alta concentración de calcio y al doble de este último valor en soluciones con potasio elevado. Los resultados son consistentes con la sugerencia que establece que el voltaje regula la permeabilidad de los canales de calcio (Reid y Smith, 1992). Hasta muy recientemente (Kluesener et al, 1995) no se había demostrado la presencia de canales de calcio en el retículo endoplásmico de células de plantas superiores y no se sabe mucho

acerca de los sistemas de transporte en mitocondrias de plantas y plástidos excepto que son capaces de acumular calcio del citosol (Evans, 1988). La mayor atención se ha enfocado en reportes recientes a los canales de calcio en tonoplasto y membrana plasmática (Terry et al, 1992). Se han encontrado en tonoplasto 2 clases de canales de calcio . Un tipo es abierto por inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y puede ser activado tanto en vesículas aisladas (Schumaker y Sze, 1987) como en vacuolas completas (Alexandre et al, 1990). Se asemejan a los canales de retículo endoplásmico de células animales en que son inhibidas por heparina, para la que tienen gran afinidad (Brosnan y Sanders, 1990). El otro tipo es abierto por diferencia de potencial, es insensible al IP3 y se caracteriza también porque el  $Zn^{2+}$  y el  $Gd^{3+}$  son inhibidores efectivos para el flujo de corriente (Johannes et al, 1992). Es relativamente poco lo que se conoce sobre los canales de calcio de membrana plasmática de plantas. Los estudios de fijación de voltaje en Charophytas indican la presencia de un canal sensible a diferencia de potencial (Shiina y Tazawa, 1987) que es bloqueado por nifedipina pero es insensible al verapamil (Tester, 1990). La existencia de un canal equivalente a éste en plantas superiores no se ha demostrado (Graziana et al, 1988). En cambio sí hay evidencia que apoya la existencia de un canal sensible al verapamil en protoplastos de *Amaranthus* (Rengel y Elliot, 1992), protoplastos de raíz de *Daucus carota* y coleoptilos de maíz (*Zea mays*) (Terry et al, 1992). El canal de calcio que reportan Kluesener y colaboradores (1995) se encuentra en el retículo endoplásmico de *Bryonia dioica* es voltaje dependiente y es bloqueado por  $Gd^{+3}$ . El gradiente eléctrico puede ser afectado por la actividad respiratoria o incluso por la acción de auxinas que tienen la propiedad de hiperpolarizar la membrana plasmática en protoplastos de mesófilo de tabaco (Barbier-

Brygoo et al, 1989). También se ha reportado que con pequeños cambios en la concentración de iones calcio pueden originarse cambios en la permeabilidad hacia otros iones, y afectar la turgencia de las células. Las plantas, además, pueden generar gradientes electroquímicos por influencia de la luz, mediante la actividad fotosintética en los cloroplastos. En la figura 15 se ilustran los sistemas que transportan calcio en la célula vegetal.

De Guzmán y de la Fuente (1984) sugieren que el nivel de calcio y su transporte influyen en el transporte basipetálico de auxinas. El transporte de las auxinas se disminuye en germinados que crecen en medios deficientes en  $\text{Ca}^{2+}$  y este efecto es dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 1 mM (De la Fuente, 1984). El transporte basipetálico de AIA y ácido naftilacético en calabaza se reduce cuando se cultiva en niveles reducidos de calcio, sugiriéndose que la principal lesión responsable de este efecto se da en el eflujo a través del acarreador de auxinas que podría ser controlado por calcio, por mecanismos aún no establecidos (Allan y Rubery, 1991).

El calcio activa la calmodulina (CaM) y promueve el transporte basipetálico de auxinas, mientras que el aluminio inhibe la CaM e interfiere con este transporte (Hasenstein y Evans, 1988), no se descarta, sin embargo, que los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  no se restrinjan a la unión a una sola proteína y que los efectos antes señalados sean producto de una coincidencia.

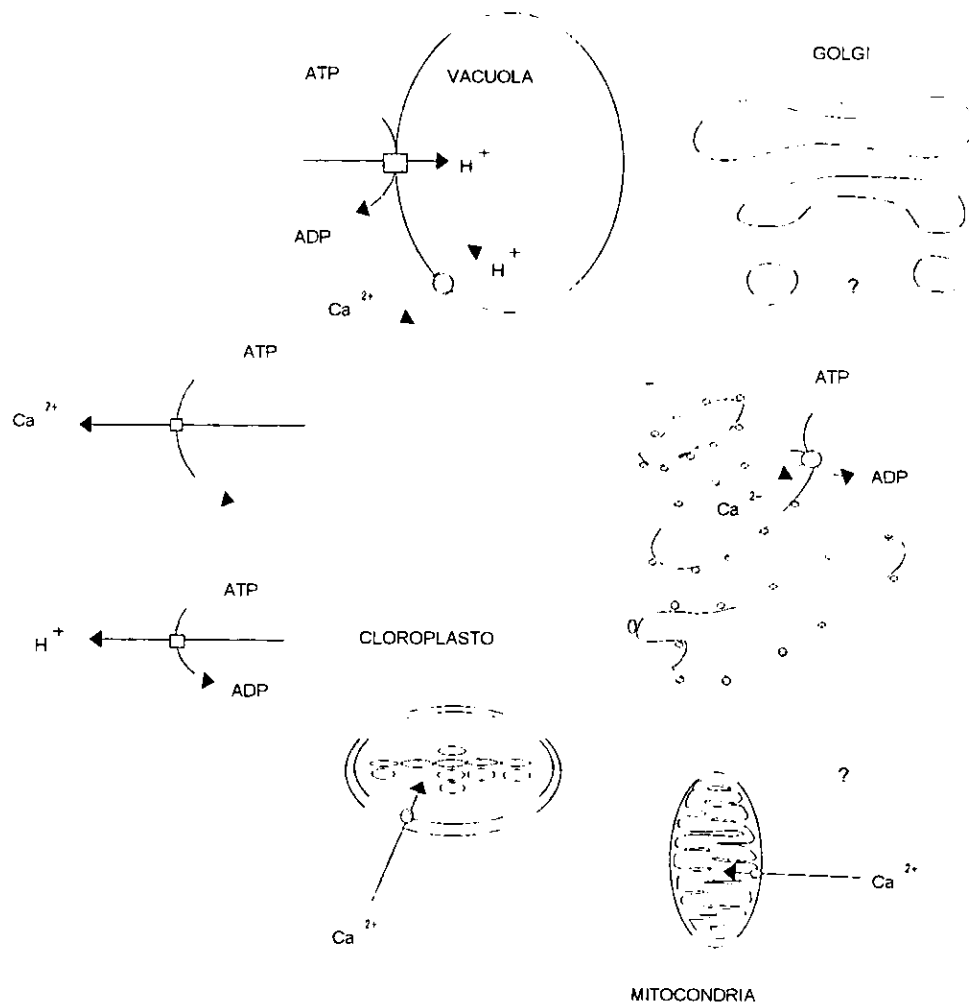


Figura 15. Los diferentes sistemas que transportan  $Ca^{2+}$  en la célula vegetal. Se representa también la participación del bombeo de protones en el transporte de calcio, y la actuación de un transportador antiparalelo (antiporier  $H^+/Ca^{2+}$ ). Adaptado de Terry et al, 1992.

## Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue establecer si las auxinas AIA y AIB afectan los procesos de formación de raíces adventicias a través de sus efectos sobre la actividad respiratoria mitocondrial. Para ello se buscó demostrar:

a) Que la mayor capacidad para promover la formación de raíces adventicias por parte del AIB con respecto al AIA, corresponde con una mayor actividad del AIB como inhibidor de la respiración mitocondrial.

b) Que la aplicación de floroglucinol inhibe la oxidación de las auxinas, pero que este efecto por sí sólo, no es capaz de elevar la respuesta rizogénica al nivel de las sustancias que interfieren con la síntesis de ATP acoplada a la respiración.

c) Que debe demostrarse la existencia de un sistema que oxide auxinas, localizado en el apoplasto, de tal manera que los efectos tóxicos para las células sean mínimos y la inactivación de las auxinas sea eficiente.

d) Que la aplicación de una sustancia fenólica que promueve la formación de raíces adventicias, podrá afectar la respiración, o disminuir la oxidación de las auxinas.

e) Que es mayor la resistencia a la oxidación de aquellas auxinas que demostraron promover una mayor actividad rizogénica.

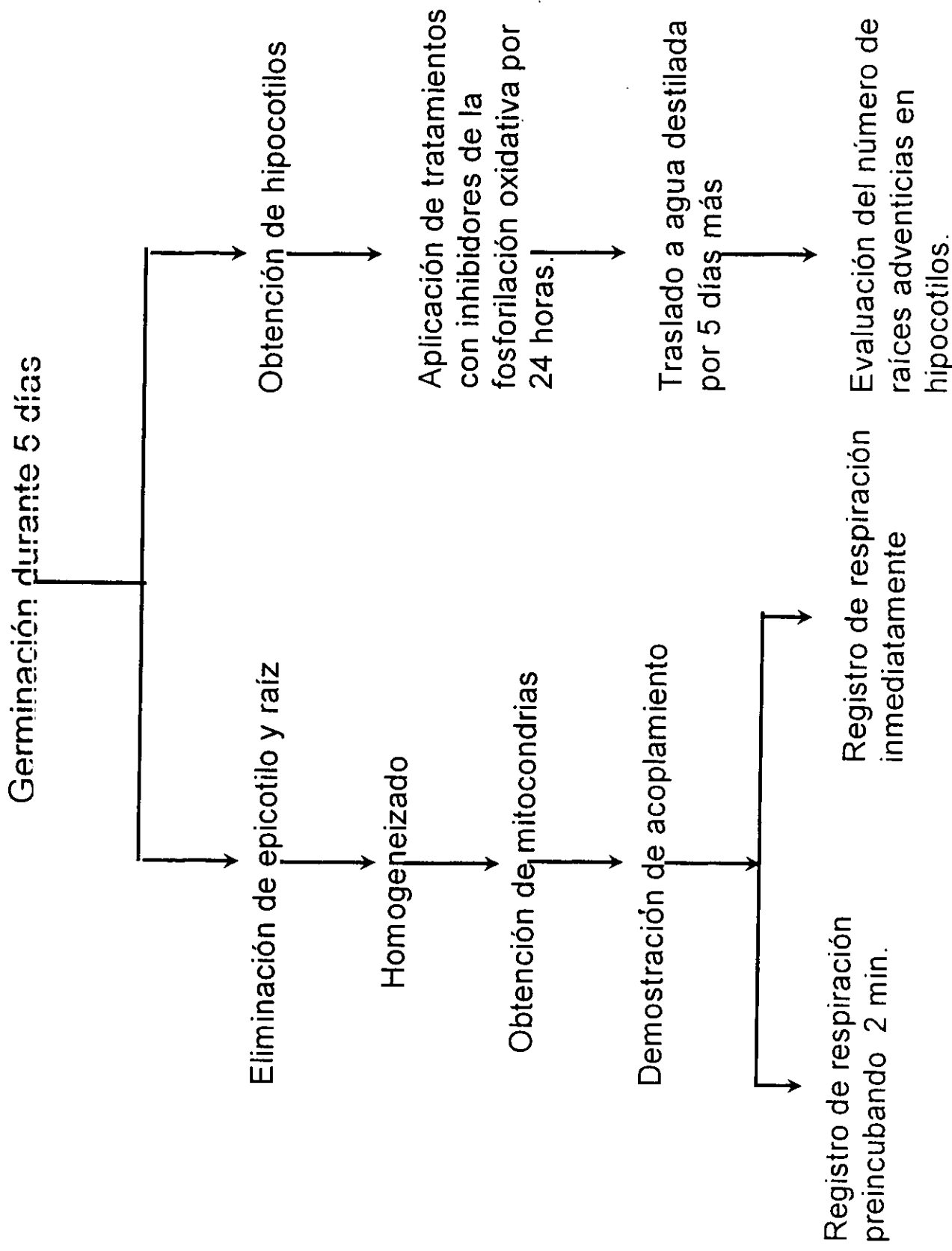
f) Que la aplicación de diferentes sustancias capaces de bloquear la síntesis de ATP acoplada a la respiración podrá simular los efectos de las auxinas sobre la formación de raíces adventicias.

## Hipótesis

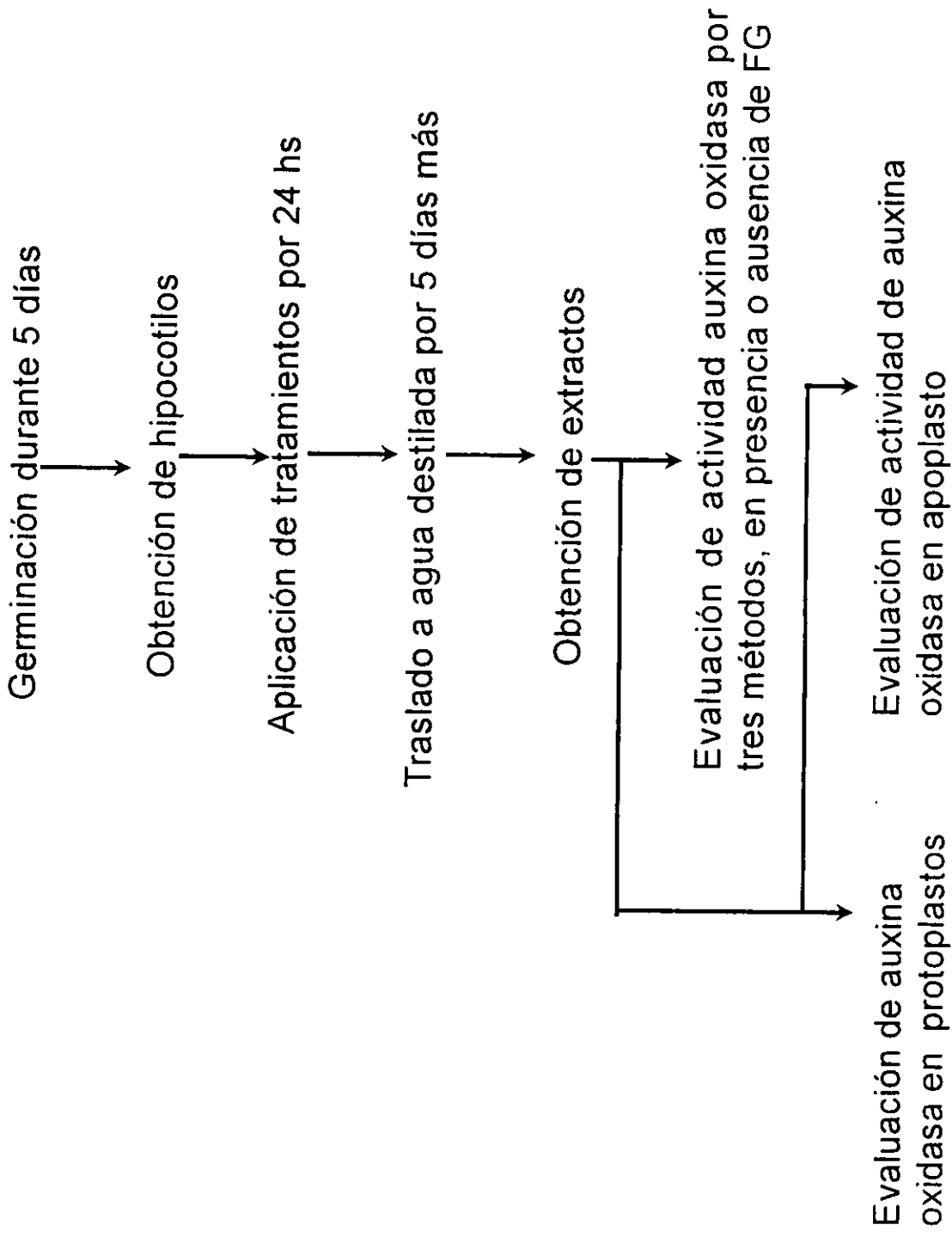
1. Propongo que las auxinas, una vez dentro de las células, tienen contacto con las mitocondrias, provocando que se inhiba la respiración. Se esperaría entonces que aquellas sustancias no auxínicas que inhiban alguna vía que repercuta en la respiración en mitocondrias aisladas, o aún en la síntesis de ATP acoplada a la respiración, simulen el efecto de las auxinas. Se esperaría también, que las auxinas que más estimulen la formación de raíces adventicias provoquen la mayor inhibición en la respiración.

2. Propongo también que es necesaria la rápida interrupción del efecto de las auxinas, para lograr reestablecer la actividad respiratoria. Pienso que esto se logra mediante la inactivación de las auxinas. Particularmente, las peróxidasas pueden cumplir con el rol de control propuesto, ya que tienen capacidad para catalizar su oxidación y se les ha encontrado asociadas a la pared celular. Por lo anterior se espera revelar una importante actividad de auxina oxidasa en el apoplasto y que ésta guarde una relación inversa con la capacidad rizogénica del tejido en que se localice. También se espera que el uso de un compuesto fenólico (el floroglucinol) que se ha reportado como compuesto no auxínico promotor de la formación de raíces adventicias en frijol mungo, podría actuar como inhibidor de peroxidasas con actividad de auxina oxidasa, provocando una mejor respuesta rizogénica, como consecuencia de la disminución en la velocidad de degradación de auxinas.

# Procedimiento para demostrar la hipótesis 1.



## Procedimiento para demostrar la hipótesis 2.





## ***Material y Métodos***

### **1. Obtención de plántulas.**

Se seleccionó el frijol mungo (*Phaseolus aureus* Roxb) como modelo experimental, ya que ofrece las ventajas de una rápida germinación y desarrollo de la planta, además por su pequeño tamaño permite obtener una población abundante en un área reducida y responde formando raíces adventicias ante la aplicación de sustancias distintas del AIA (Hess, 1961). Este último aspecto resulta ventajoso si se considera que la comparación de los efectos del AIA con los de otras sustancias puede proporcionar elementos valiosos en la construcción de modelos explicativos sobre la rizogénesis.

Se lavaron 25 g de semillas de frijol mungo (*Phaseolus aureus* Roxb) de origen comercial con agua corriente, posteriormente se sumergieron en Hipoclorito de Sodio al 4% durante 25 minutos; se lavaron nuevamente con agua destilada durante 15 min con el propósito de eliminar los residuos del desinfectante utilizado. Durante las 24 horas siguientes se mantuvieron sumergidas en agua, en condiciones de obscuridad, con cambios periódicos de agua. Una vez que las semillas se hidrataron, se trasladaron a un recipiente de 30x30x10 cm conteniendo agrolita (0.1 m<sup>3</sup> dicalite S.A.) hasta un 50% de su capacidad, la agrolita se mantuvo a su máxima hidratación utilizando exclusivamente agua destilada. Estos recipientes permanecieron 5 días en una cámara de germinación con obscuridad permanente para la obtención de plántulas etioladas y para las plántulas iluminadas, 6 días en fotoperíodo de 16 hs luz (90  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) X 8 de oscuridad, con una temperatura de

28 °C y con una humedad relativa de 70%. Al término de estos días se obtuvieron plántulas de 12 cm de longitud en promedio del brote de la raíz principal al ápice.

## **2.Corte y tratamientos.**

Las plántulas obtenidas fueron cortadas 7 cm por debajo del nodo cotiledonar evitando el estrangulamiento en el lugar de corte. Cada vez que se probó el efecto de alguna sustancia o condición, se tuvo un grupo control tratado con agua destilada. Cada grupo constó de un total de 34 segmentos de plántulas (excepto en los casos que especifiquen otra condición). Al término de los tratamientos las plántulas marchitas fueron desechadas, de ahí que el número de hipocotilos difiera entre los diferentes tratamientos. Los procedimientos y tiempos se definieron de acuerdo a Hess (1961) como se describe a continuación: Los tratamientos se aplicaron a las plántulas sumergiéndolas hasta una profundidad de 4 cm y así se mantuvieron por un espacio de 24 horas, posteriormente se trasladaron a agua destilada y así se mantuvieron durante 5 días más, agregando el agua destilada que se hubiera perdido por evaporación. Los cotiledones fueron retirados antes de aplicar los tratamientos. En los casos en que fue necesario emplear etanol al 96% para disolver el soluto, se adicionó la misma cantidad de alcohol en el lote control, para asegurar que la respuesta diferencial no se atribuyera a la adición de alcohol. Se realizaron tratamientos control acidificando con HCl al mismo pH alcanzado en las soluciones que contenían auxinas, para descartar que la variación en éste fuera responsable de los efectos observados.

Se formaron 5 grupos experimentales que fueron mantenidos a 28 °C y 70% de humedad relativa.

1. Grupo FG: constó de 4 tratamientos (agua destilada, FG 10 µM, FG 100 µM y FG 1 mM). Se partió de plántulas etioladas y decapitadas al 5° día de germinación inmediatamente por debajo del nodo cotiledonar y se mantuvieron en la oscuridad durante los tratamientos.

2. Grupo de segmentos no decapitados e iluminados: Constó de 4 tratamientos (agua destilada, AIA 100 µM, AIB 100 µM y FG 1mM). Se proporcionó un fotoperíodo de 16 hs luz X 8 hs de oscuridad, con una radiación de 57 µmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante la germinación y también durante el tratamiento.

3. Grupo de segmentos no decapitados mantenidos en la oscuridad. Constó de los mismos tratamientos que en el grupo 2, pero no se aplicó luz. Las plántulas fueron germinadas en la oscuridad.

4. Grupo de segmentos decapitados mantenidos en la oscuridad. Constó de los mismos tratamientos que el grupo 2, pero las plántulas fueron decapitadas inmediatamente por debajo del nodo cotiledonar al quinto día de germinación (24 hs antes de tomar los segmentos a partir de plántulas etioladas) y se mantuvieron en la oscuridad.

5. Grupo de segmentos decapitados e iluminados. Constó de los mismos tratamientos que el grupo 2, pero las plántulas se decapitaron como se describió para el grupo 4.

### **3. Obtención del extracto crudo.**

Los extractos se obtuvieron de plántulas de frijol mungo crecidas durante 6 días en las condiciones ya descritas.

Se pesaron 40 g (peso fresco) de tejido (hojas raíz o tallo) y se homogeneizaron en 80 ml de buffer que contenía: PVPP al 1% (polivinilpolipirrolidona insoluble Sigma Chemicals No. de catálogo P6755) y TRIS-HCl 10 mM pH 7.6, durante 20 seg. El homogeneizado se filtró en 8 capas de gasa con malla de 2 mm y el filtrado se centrifugó a 12,787 x g durante 30 min, se recuperó el sobrenadante por decantación y este extracto se empleó para los registros del AIA residual, de consumo de oxígeno y espectrofotométrico.

#### **4. Obtención del extracto concentrado de proteínas.**

Se siguió lo señalado en 3, pero se continuó con el siguiente procedimiento: Se agregó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta una saturación del 60%, agregando cristales lentamente y agitando en frío. La mezcla saturada se centrifugó a 8,880 x g durante 15 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en un total de 4 ml de agua desionizada. El concentrado de proteínas se colocó en una membrana que permitía la diálisis de moléculas de hasta 5000 daltons de PM y se dializó contra 1 l de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.3 durante 24 hs realizando 3 cambios de buffer, después de esto se centrifugó el dializado a 12,787 x g durante 15 min, se recuperó el sobrenadante correspondiente al concentrado de proteínas (Kokkinakis y Brooks, 1979a), se determinó la proteína total por el método de azul de Comassie utilizando albúmina de suero de bovino como standard (Bradford, 1976). Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

Este concentrado se empleó en la valoración de la actividad de AIAox por el registro del AIA residual, ya que los registros espectrofotométrico y polarográfico presentaron dificultades que se discuten más adelante. También se utilizó para desarrollar el isoelectroenfoque.

### **5. Obtención del patrón isoenzimático de las plántulas tratadas con AIA, AIB y FG.**

Se lavaron 5 g de hipocotilos con agua destilada y se homogeneizaron en 5 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1M pH 5.7. El homogeneizado se filtró en 8 capas de gasa con malla de 2 mm y posteriormente se centrifugó a 12,787 x g. Se recuperó el sobrenadante considerándolo extracto crudo. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C. Se determinó el contenido de proteína del extracto crudo de acuerdo a Bradford, M. (1976).

La separación electroforética de los extractos obtenidos de las plántulas control y las que fueron tratadas con FG, AIA y AIB se realizó en gel de acrilamida, en sistema discontinuo con una concentración final de 7.5% de acrilamida, siguiendo el procedimiento descrito por Davies (1964). Se utilizó el sistema buffer no disociante de tris-glicina 0.1 M pH 8.3 para el corrimiento. El gel se preparó en un tubo de cristal de 5 mm de diámetro interior y de 10 cm de largo. El extracto crudo se depositó en la parte superior del tubo ajustando la proteína a 150 µg por tubo. Se aplicó una diferencia de potencial de 1 voltio por tubo durante la primera hora y una corriente inicial de 25 mA. La diferencia de potencial aumentó a dos voltios por gel durante las siguientes 1.5 horas o hasta que el colorante (azul de bromofenol) alcanzó la parte inferior del tubo. Todas las operaciones de separación se llevaron a cabo a 4 °C.

### **6. Fraccionamiento de isoenzimas con actividad de AIA oxidasa por electroforesis.**

El fraccionamiento de isoenzimas de AIA oxidasa se llevó a cabo siguiendo a Hames (1981). Este consistió en la recuperación de las isoenzimas separadas en geles de acrilamida. Se realizó un extracto crudo a partir de las plántulas que no recibieron ningún tratamiento, se realizó en seguida una electroforesis en poliacrilamida de poro medio (11% p/v, pH 8.9) en tubos de vidrio de 140 mm de largo x 15 mm de diámetro interno. La

solución buffer en contacto con los electrodos contenía TRIS 25 mM, glicina 192 mM, con pH final de 8.3. Se aplicaron alícuotas de 1 ml (1 mg de proteína) y se realizó el corrimiento con 50 mA de corriente directa. Al término del corrimiento se determinaron los sitios de concentración de cada isoenzima, por comparación con las bandas reveladas en geles corridos simultáneamente y que fueron revelados con azul rápido BB base (Sigma Chemicals No. de catálogo F-0125), de acuerdo al procedimiento que se indica en 9. Se hicieron cortes de 4 mm de espesor de 3 geles y posteriormente se homogeneizaron suavemente con un tubo de vidrio, en 5 ml de buffer de acetato de sodio 0.2 M pH 4.2. Se mantuvieron durante toda la noche en el buffer a 4 °C y posteriormente se decantaron para eliminar los restos de acrilamida. Se realizó una nueva corrida electroforética de las fracciones así obtenidas revelándose la actividad de AIAox con azul rápido BB base y la proteína total con azul de Coomassie R250 y nitrato de plata para observar las posibles bandas enzimáticas o proteicas contaminantes. Se evaluó la actividad de las isoenzimas sometidas a este procedimiento de purificación mediante la técnica Gordon y Weber (1951) midiendo AIA residual. En estos ensayos se valoró el efecto del FG adicionado *in vitro*.

#### **7.Preparación de la fracción precipitada con sulfato de amonio para el registro de la AIA oxidasa en raíz y tallo.**

Se siguió lo señalado en 4, sólo que en lugar de partir de 40 g de plántulas, se tomaron de raíces o de tallos.

#### **8.Electroforesis en placa de la fracción precipitada con Sulfato de Amonio.**

Se realizó una electroforesis analítica en gel de poliacrilamida de acuerdo a Laemmli (1970). La solución buffer que bañó a los electrodos contenía TRIS 25 mM, glicina 192 mM con un pH final de 8.3. Se añadieron 50 µl (100 µg de proteína) del extracto dializado en la parte

superior del gel justo antes de iniciar el corrimiento. La temperatura del buffer fue mantenida a 4 °C. Se aplicaron 25 mA por 10 carriles durante los primeros 30 min, disminuyendo después a 20 mA hasta que concluyó el corrimiento (cuando el frente alcanzó el extremo inferior del gel).

### **9.Revelado de la AIA oxidasa.**

En primer término, se reveló la actividad de AIAox de los geles obtenidos del procedimiento 5, sumergiéndolos en un medio conteniendo: AIA 0.66 mM, ácido p-coumárico 0.1mM,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , ácido oxálico 1 mM,  $H_2O_2$  5  $\mu M$ , azul rápido BB base al 0.1% p/v en acetato de sodio 25 mM pH 4.0 (De Forchetti y Tigier, 1983). Considerando que este procedimiento reveló bandas en ausencia de AIA, AIB o FG, se sustituyó por el procedimiento que se describe: Para revelar el patrón isoenzimático de la AIA-ox se sumergieron los geles en un medio de revelado que describe Talwar, G. et al, (1985) conteniendo 1 parte de la solución A (4 mg Azul Rápido BB base/ml de Etanol), 2 partes de la solución B (16.4 mg de Acido p-coumárico+17.6 mg de AIA disueltos en Etanol y aforados a un volumen de 50 ml +2.4 ml de Peróxido de Hidrógeno al 0.1%) y 1 parte de la solución C (buffer de Acetato de Sodio 0.2 M pH 4.2). Los geles se mantuvieron en esa solución a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que las bandas fueron reveladas.

### **10.Tinción de proteínas totales con plata amoniacal.**

Se sumergió el gel durante 30 min en 100 ml de solución de metanol-ácido acético-agua 5:1:4 v/v, posteriormente se lavó durante 12 horas en metanol-ácido acético-agua 1:2:17 v/v. Se remojó el gel en una solución de glutaraldehído al 10% durante 30 min y enseguida se lavó con 1 litro de agua destilada durante 2 horas, haciendo cambios de agua cada 25 min, se drenó el agua y se remojó en una solución de plata amoniacal (15 ml de NaOH 0.2

M + 2 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 40% + 3 ml de solución al 19.4% p/v de  $\text{AgNO}_3$ ) durante 15 min. Se lavó durante 2 min en una solución de ácido cítrico al 0.005% y formaldehído al 0.019%; las bandas aparecieron a los pocos segundos, se retiró el gel y se lavó con agua destilada cuando el fondo empezó a oscurecerse.

### **11. Cuantificación de la actividad total de AIAox, mediante el registro del AIA residual.**

La actividad total de AIAox se registró de acuerdo a la técnica descrita por Pressey, R. (1990), y consistió en la medición del AIA residual en la mezcla reaccionante empleando el reactivo de Salkowski. La mezcla de ensayo consistió en 0.2 ml de Buffer de Acetato de Sódico 0.1 M pH 4.2, 0.3 ml de  $\text{MnCl}_2$  0.107 mM, 0.2 ml de 2,4-diclorofenol 1 mM, 0.3 ml de AIA 1 mM, 0.4 ml de agua destilada y 0.2 ml de extracto crudo. Se incubó la mezcla durante 20 minutos en la obscuridad a 30 °C, después de lo cual se agregaron 2 ml de reactivo de Salkowski. El reactivo de Salkowski se preparó agregando 15 ml de  $\text{FeCl}_3$  0.5 M, 500 ml de agua destilada y 300 ml de ácido sulfúrico concentrado de acuerdo con Sequeira y Mineo (1966). Posteriormente se mantuvieron las muestras en la obscuridad durante 30 minutos para que el color formado fuera estable, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 525 nm. Las lecturas de absorbancia fueron convertidas a  $\mu\text{moles}$  de AIA residual, mediante una curva patrón que presentó un comportamiento lineal entre 0 y 300  $\mu\text{M}$ . Una unidad de actividad de AIAox se definió como la cantidad de enzima que permitió la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de AIA  $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup> minuto<sup>-1</sup> a 30 °C y pH 4.2.



## 12. Cuantificación de la actividad de auxina oxidasa por espectrofotometría.

Se agregaron 4  $\mu\text{g}$  de peroxidasa de rábano tipo II ó 100  $\mu\text{g}$  de proteína del concentrado obtenido en 3, a 3 ml de medio de reacción conteniendo uno o más de los siguientes compuestos: DCP 120  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  6  $\mu\text{M}$ , AIA 300  $\mu\text{M}$ , AIB 300  $\mu\text{M}$ , FG 300  $\mu\text{M}$  y buffer de citratos 5 mM pH 4.2. Se realizaron espectros de absorción al tiempo cero y a los 5 min realizando un barrido entre los 220 y los 300 nm en un espectrofotómetro Phillips modelo PU8710, a una velocidad de 2000 nm/min y un ancho de banda de 2 nm. El tiempo cero correspondió al último instante antes de adicionar peroxidasa de rábano tipo II o concentrado proteico. Se varió la composición del medio de reacción que siempre incluyó buffer citratos como se describe a continuación y se eligieron aquellas que permitieron alcanzar actividades mayores.

<i>Ensayo</i>	<i>Composición del medio</i>
1	AIA + peroxidasa
2	AIA + peroxidasa + DCP
3	AIA + peroxidasa + DCP + peróxido
4	AIA + peroxidasa + DCP + FG
5	AIA + peroxidasa + peróxido
6	AIB + peroxidasa + DCP
7	AIB + peroxidasa + peróxido
8	AIB + peroxidasa + DCP + peróxido
9	AIB + peroxidasa + peróxido + FG
10	Peroxidasa + peróxido + DCP + FG

### **13. Cuantificación de auxina oxidasa por polarografía.**

Se preparó la mezcla indicada en el párrafo anterior, pero en lugar de registrar espectrofotométricamente, se cuantificó la disminución del consumo de O<sub>2</sub> disuelto en la celda de reacción, por medio de un electrodo de oxígeno tipo Clark Hansatech Mod. LS1 (Kckkinakis y Brooks, 1979b). Se corrigió la solubilidad del O<sub>2</sub> para la altura del municipio de Tlalnepantla (2 251 msnm) y considerando una temperatura de 30<sup>0</sup>C, correspondiendo a 400 ng átomo de oxígeno/ml.

### **14. Cuantificación de la actividad de peroxidasa.**

Se agregaron 100 µg de proteína a 3 ml de medio de reacción conteniendo: o-dianisidina 200 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM y buffer de citratos 50 mM pH 4.8. Se midió el aumento de absorbencia a 430 nm (Pressey, 1990) después de 5 min.

### **15. Fraccionamiento por electroenfoque del extracto de raíz de frijol mungo.**

Se homogeneizaron en la oscuridad 50 g de raíces obtenidas de plántulas etioladas de frijol mungo de 6 días de edad, con 100 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.6 conteniendo 1% de PVP :nsoluble. Se centrifugó a 19980 x g durante 30 min, se saturó el sobrenadante al 60% con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se centrifugó a 12787 x g durante 15 min. Se resuspendió la pastilla en 5 ml de agua destilada y se dializó contra 1000 ml de buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.3. El dializado constituyó la muestra concentrada.

El electroenfoque se realizó de acuerdo a Hochstrasser et al (1990) con 1% de anfolitos (rango 4 a 10 de pH) en el Rotofor (ROTOFOR IEF CELL BIO-RAD No. CAT. 170-2950) durante 4 horas a temperatura de 4 °C, 1 rpm y con 250 V, 25 mA y 5 W iniciales . Se

observó que la evolución de la corriente fue estable hacia las cuatro horas con 550 V y 22 mA. Los electrolitos utilizados en el electroenfoque fueron NaOH 0.1 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M.

#### **16. Aislamiento de protoplastos de radículas de frijol mungo.**

Se desinfectaron 25 g de semillas de frijol mungo con hipoclorito de sodio al 4% (blanqueador comercial) durante 30 min y se enjuagaron 5 veces con agua destilada. Se germinaron en cajas de Petri con agua destilada en la obscuridad durante 24 hs a 30 °C. Se cortaron 10 g de radículas de 1 cm de largo en fragmentos de 3 mm y se plasmolizaron en 15 ml de medio CPW13M conteniendo: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 µM, KNO<sub>3</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 mM y manitol 0.6 M con pH 5.8 (ajustado con KOH) durante 30 min, posteriormente se trasladaron a solución fresca de CPW13M conteniendo 1000 U de celulasa y 75 U de pectinasa, manteniéndose en agitación durante 5 hs a 30°C con la finalidad de digerir las paredes celulares. Se filtró a través de un tamiz de nylon con malla de 60 µm y el filtrado se centrifugó a 555 x g durante 20 min a 10°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 8 ml de sacarosa 0.7 M, repartiendo la suspensión resultante en 2 tubos, a cada uno de los cuáles se les añadieron 4 ml de solución conteniendo: sacarosa 350 mM, manitol 300 mM, MES-TRIS 25 mM pH 6.5 y 2 ml de solución con: manitol 0.6M y MES-TRIS 25 mM pH 6.5 (las soluciones se agregaron cuidadosamente para formar el gradiente). El gradiente formado se centrifugó a 424.6 x g durante 10 min en centrífuga clínica de ángulo variable. Los protoplastos fueron extraídos con pipeta Pasteur ya que flotaron en la interfase de manitol 0.6 M y sacarosa 350 mM/manitol 300 mM según se pudo comprobar al observarlos por microscopía de campo claro.

#### **17. Isoperoxidasas en pared celular.**

Se fraccionó el sobrenadante que se obtuvo después de centrifugar a 555 x g del procedimiento anterior (16), en lugar de desecharlo. Este sobrenadante corresponde al

FALTA PAGINA

No.

724

concentraciones entre 0 y 100 mM. Se observó el efecto de estos compuestos al instante de su adición y después de preincubación durante 2 minutos.

### **19. Cuantificación del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas.**

La medición de la respiración se realizó mediante el seguimiento polarográfico de la disminución de oxígeno en la celda de reacción. Se agregaron volúmenes apropiados de fracción mitocondrial obtenida de 18, solución de auxinas y medio de reacción compuesto de: Manitol 0.3 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y KCl 10 mM. Se ajustó el pH a 7.2.

Adicionalmente se agregaron 40  $\mu\text{l}$  de una solución 40 mM de NADH en la celda de 1 ml, como sustrato para iniciar el transporte electrónico. La reacción se hizo limitante al suministro de ADP para formar ATP. Se incubó a 30 °C con agitación constante.

El efecto inhibitor o desacoplante de las auxinas y el FG se estableció a través de la determinación de la velocidad de consumo de oxígeno en la respiración de mitocondrias en estado 3 respiratorio.

### **20. Cuantificación de iones en mitocondrias y protoplastos.**

Después de aislar mitocondrias de hipocotilo mediante el procedimiento indicado en 18, se colocaron 500 mg de proteína mitocondrial en 3 ml de medio de reacción conteniendo: Manitol 0.3 M, KCl 5 mM, NaCl 5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, NADH 1.6 mM, ADP 100  $\mu\text{M}$  y AIA o AIB 100  $\mu\text{M}$ . Se mantuvieron en agitación a 30°C durante 20, 40 y 60 min, transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla de reacción a 19800  $\times$  g por 5 min, se desechó el sobrenadante y se le agregaron a la pastilla 2 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado, dejando la digestión en reposo hasta el momento del registro.

Para el caso de los protoplastos se incubaron 200  $\mu\text{l}$  de protoplastos recién aislados en 3 ml de medio de reacción que contuvo para el caso de sodio: NaCl 1 mM, KCl 1 mM,  $\text{CaSO}_4$  1 mM, manitol 0.7 M y Mes-Tris 2mM pH 6; para el caso de potasio: KCl 1 mM,  $\text{CaSO}_4$  1 mM, manitol 0.7 M y Mes-tris 2 mM pH 6; para el caso del calcio:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM,  $\text{CaSO}_4$  1 mM, manitol 0.7 M y Mes-Tris 2 mM pH 6.5. Se mantuvieron en agitación a 30°C durante 25 min y posteriormente se centrifugaron a 17483 x g en microfuga Eppendorf durante 5 min, se desechó el sobrenadante y a la pastilla de protoplastos se le agregaron 2 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado (65%) y se mantuvo la digestión hasta el momento de la medición (Mettler y Leonard, 1979). El volumen de medio atrapado en la pastilla que se obtuvo por sedimentación se estimó en 30  $\mu\text{l}$ , al medir el volumen de agua que reemplaza al de la pastilla con una microjeringa, y en este volumen están contenidos 0.03  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  (ya que los medios contenían 1  $\mu\text{mol}$  por ml), que representa un nivel de calcio que si bien no es considerable, tampoco es despreciable tomando en cuenta la concentración submicromolar que se encuentra en el citosol; sin embargo, la reducción de calcio en el medio de extracción condujo a la lisis de los protoplastos, así, se siguió este procedimiento considerando que se tendría un margen de error constante entre los diferentes tratamientos.

Las muestras se digirieron hasta que tuvieron apariencia cristalina, sin residuos sólidos de materia orgánica. El  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  fueron determinados por espectroscopía de absorción atómica utilizando un espectro de absorción atómica Pye Unicam Mod. SP 192. El Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> se determinaron por flamometría empleando un flamómetro Corning 400.

## Resultados

En la mayoría de las condiciones probadas, se encontró que la aplicación de AIA, AIB y Floroglucinol promovió la iniciación de raíces adventicias en los segmentos de plántulas de frijol que fueron tratados basalmente. Se probaron concentraciones diferentes de AIA y AIB, en trabajos previos, encontrándose que la mayor respuesta se obtuvo con una concentración 100  $\mu\text{M}$  en ambos casos. Se decidió estimar el número de raíces iniciadas a partir de los tratamientos, ya que se consideró de mayor importancia para establecer la capacidad inductora de raíces adventicias el efecto cuantitativo, sobre la diferenciación del tejido y no la masa o el volumen de tejido diferenciado. El efecto de la aplicación basal de Floroglucinol (FG) a plántulas etioladas y decapitadas en diferentes concentraciones se puede apreciar en la tabla 1. En ésta puede observarse que la concentración 1mM tuvo un efecto más pronunciado<sup>3</sup> que las demás, sin embargo, el incremento en el número de raíces laterales osciló entre 18.45% y 55.35%, en comparación con 189.92% de incremento que provocó el AIB en condiciones similares (en plántulas decapitadas y etioladas), como se muestra en la tabla 4. Esto demuestra que la aplicación de un compuesto fenólico como el floroglucinol (en las diferentes concentraciones probadas) no fue capaz de elevar la respuesta rizogénica al nivel que promueve el AIB, la auxina que demostró tener el mayor efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial (figura R17). En los grupos cuyos resultados se muestran en las tablas 2, 3, y 4 se encontró que el AIB fue el tratamiento que provocó un mayor enraizamiento. En la tabla 2 se muestra que cuando se mantuvieron las

---

<sup>3</sup>Todas las comparaciones fueron realizadas mediante análisis de varianza por bloques aleatorizados, tomándose un nivel de significancia  $\alpha=0.01$ . Se usó la prueba de Tukey para determinar las diferencias entre pares

plántulas en iluminación y no fueron decapitadas, se tuvo la menor estimulación de este proceso (167.86%) por parte del AIB entre todos los tratamientos probados. El AIA promovió en un 31.14% la formación de raíces adventicias (respuesta un poco menor que la observada en plántulas etioladas no decapitadas, que fue del 35.4%) y el FG promovió el enraizamiento en un 36.66% (que representó la segunda mayor respuesta que promovió el FG). Sin embargo, aún cuando la capacidad del AIB para formar raíces adventicias disminuyó en los tratamientos con luz, esta disminución no correspondió a lo esperado, suponiendo que la luz ayudaría a reestablecer los niveles de ATP. Según puede apreciarse, el nivel de estimulación de las auxinas disminuyó cuando las plántulas crecieron bajo iluminación, con respecto a las que fueron etioladas y decapitadas (ver tabla 4), El tratamiento con FG, incrementó su efecto en presencia de luz. En la tabla 3 se muestra que cuando las plántulas no se decapitaron y fueron mantenidas en la oscuridad, el AIB estimuló en 178.94%, mientras que el FG no presentó diferencia significativa con respecto al control y el AIA estimuló moderadamente (35.4%). En la tabla 4 se aprecia el mayor efecto promotor del AIB 100  $\mu$ M en plántulas etioladas y decapitadas(189.92%), también se observa que el AIA 100  $\mu$ M promovió en 52.94% y el FG 1mM en 12.61%. Finalmente, no se logró comparar la respuesta rizogénica entre segmentos normales y decapitados en presencia de luz, porque los segmentos iluminados decapitados no sobrevivieron.

Se buscó demostrar la capacidad del floriglucinol como inhibidor de la actividad de auxina oxidasa, para establecer si la promoción en la formación de raíces adventicias encontraba explicación con esta base. Se buscó en primer lugar una diferencia en la



capacidad para oxidar a estas auxinas y en segundo lugar, se buscó evidenciar si el FG podría provocar una disminución en dicha actividad. Al revelar la actividad de AIA oxidasa de los extractos crudos de hipocotilos de frijol mungo (obtenidos de acuerdo al procedimiento 9 de material y métodos), se revelaron bandas cuya intensidad varió de acuerdo al tratamiento del que fueron objeto los hipocotilos y de acuerdo a la presencia o ausencia de FG en el medio de revelado. En este último caso, se encontró inconveniente el medio reportado por Forchetti y Tigier (1983), ya que en éste se revelaron bandas en ausencia de AIA (que fue el sustrato oxidable a registrar). Al sustituir el medio de reacción por el que reportaron Talwar et al (1985), se comprobó que las bandas reveladas demostraban la oxidación del AIA, puesto que los geles en presencia de una mezcla de todos los componentes del medio de revelado con excepción del AIA, no mostraron bandas.

**TABLA 1. RESPUESTA DE LOS SEGMENTOS ANTE LA APLICACION DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE FLOROGLUCINOL.**

Tratamiento	Raíces/hipocotilo	% Promoción	Número de hipocotilos
Control	16.8 ± 4.6 a	0	21
FG 10 µM	16.4 ± 6.2 a	-2.4	23
FG 100 µM	19.9 ± 6.3 b	18.45	32
FG 1 mM	26.1 ± 5.9 c	55.35	26

*Respuesta rizogénica de segmentos de plántulas de frijol mungo etioladas y decapitadas, ante la aplicación de un trihidroxifenol (floroglucinol) a 3 diferentes concentraciones. Se expresa la media ± la desviación estándar. Las letras a, b, c, se emplearon para señalar diferencias entre los tratamientos a un nivel de significancia de 0.01.*

**TABLA 2. RESPUESTA DE SEGMENTOS NO DECAPITADOS E ILUMINADOS**

Tratamiento	Raíces/hipocotilo	% Promoción	Número de hipocotilos
Control	15.0 ± 5.2 a	0	28
AIA 100 µM	19.7 ± 10.8 b	31.14	33
AIB 100 µM	40.3 ± 13 c	167.86	29
FG 1 mM	20.5 ± 10 b	36.66	33

*Respuesta rizogénica ante la aplicación de 2 auxinas y un fenol en segmentos de plántulas de frijol mungo que fueron iluminadas como se describe en material y métodos. Los índices a, b y c se emplearon para señalar diferencias entre los tratamientos.*

**TABLA 3. RESPUESTA DE SEGMENTOS NO DECAPITADOS MANTENIDOS EN LA OSCURIDAD**

Tratamiento	Raíces/hipocotilo	% Promoción	Número de hipocotilos
Control	13.2 ± 5.3 a	0	20
AIA 100 µM	17.9 ± 6.0 b	35.4	17
AIE 100 µM	37.0 ± 15.3 c	178.94	27
FG 1 mM	13.1 ± 6.3 a	-0.98	27

*Respuesta rizogénica ante la aplicación de 2 auxinas y un fenol en segmentos de plántulas de frijol mungo etioladas y mantenidas en la oscuridad, de acuerdo a como se describe en material y métodos. Los índices a, b y c se emplearon para señalar diferencias entre los tratamientos.*

**TABLA 4. RESPUESTA DE SEGMENTOS DECAPITADOS MANTENIDOS EN LA OSCURIDAD**

Tratamiento	Raíces/hipocotilo	% Promoción	Número de hipocotilos
Control	11.9 ± 4.7 a	0	30
AIA 100 µM	18.2 ± 4.6 b	52.94	29
AIB 100 µM	34.5 ± 13.9 c	189.92	26
FG 1 mM	13.4 ± 6.4 a	12.61	30

*Respuesta rizogénica ante la aplicación de 2 auxinas y un fenol en segmentos de plántulas de frijol mungo etioladas, decapitadas y mantenidas en la oscuridad, de acuerdo a como se describe en material y métodos. Los índices a, b y c se emplearon para señalar diferencias entre los tratamientos.*

En la figura R1 se muestra un esquema y una fotografía de las bandas con actividad de AIA oxidasa que pudieron revelarse empleando el medio reportado por Talwar et al (1985). Los carriles 1, 2, 3 y 4 contuvieron extractos obtenidos de plántulas decapitadas y eticiladas que fueron tratadas con agua destilada, FG 1 mM, AIA 100 $\mu$ M y AIB 100  $\mu$ M, respectivamente. En el carril 1 se observaron 3 bandas (A, B y E), la más intensa correspondió a la isoenzima que apareció más cerca del cátodo y que se denominó banda A. La intensidad de esta banda se incrementó gradualmente hacia los carriles 2, 3 y 4. Las bandas B y E se apreciaron con una muy ligera mayor intensidad en los carriles 2, 3 y 4. En el carril 4 fue muy notoria la presencia de las bandas C y D, que correspondieron a isoenzimas que se revelaron más cerca del ánodo. En resultados que no se muestran, se encontró que a los cuatro días el número de bandas con actividad de AIAox era menor que el obtenido a los 6 días, coincidiendo esto con el incremento de la actividad de AIAox en el tiempo, reportado por Mato, Rúa y Ferro (1988).

Ante la respuesta obtenida, se buscó una explicación, examinando las bandas con actividad presentes en tallo y raíz, en tanto que la primera diferencia observada en los segmentos de plántulas en los diferentes tratamientos fue el número de raíces que fueron capaces de formar. En la figura R2 se presentan las bandas con actividad de AIA oxidasa derivadas de tallo o de raíz. Puede notarse que las bandas A, B, D y E se presentan en extractos obtenidos de tallo. En extractos de raíz, se encuentra una banda C, no se distingue la banda E, que apenas era perceptible en el tallo, la banda B se aprecia con una intensidad similar a la del tallo y se intensifica la banda A.

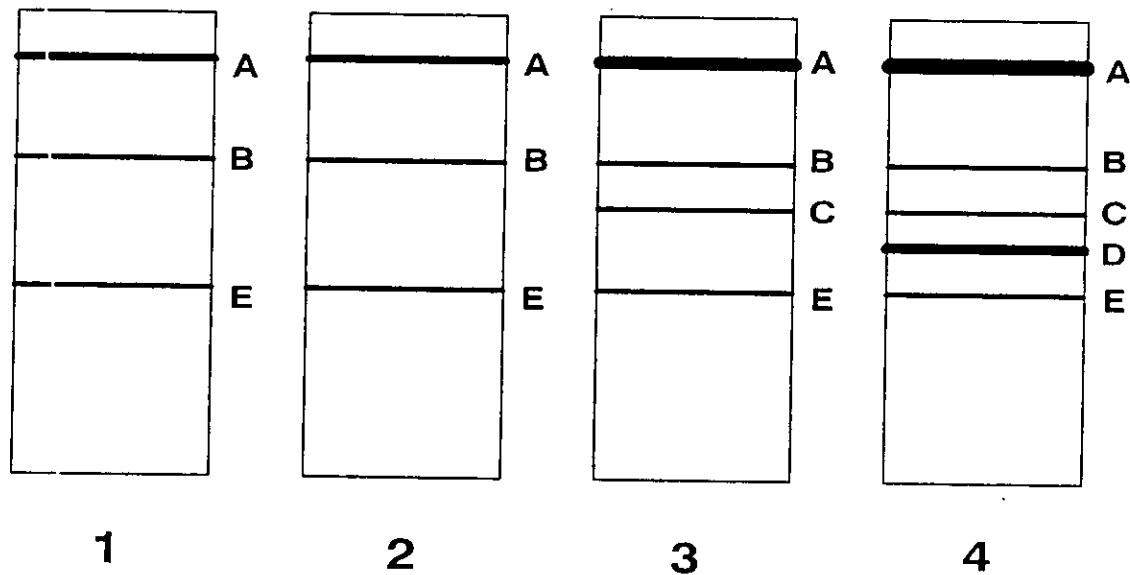
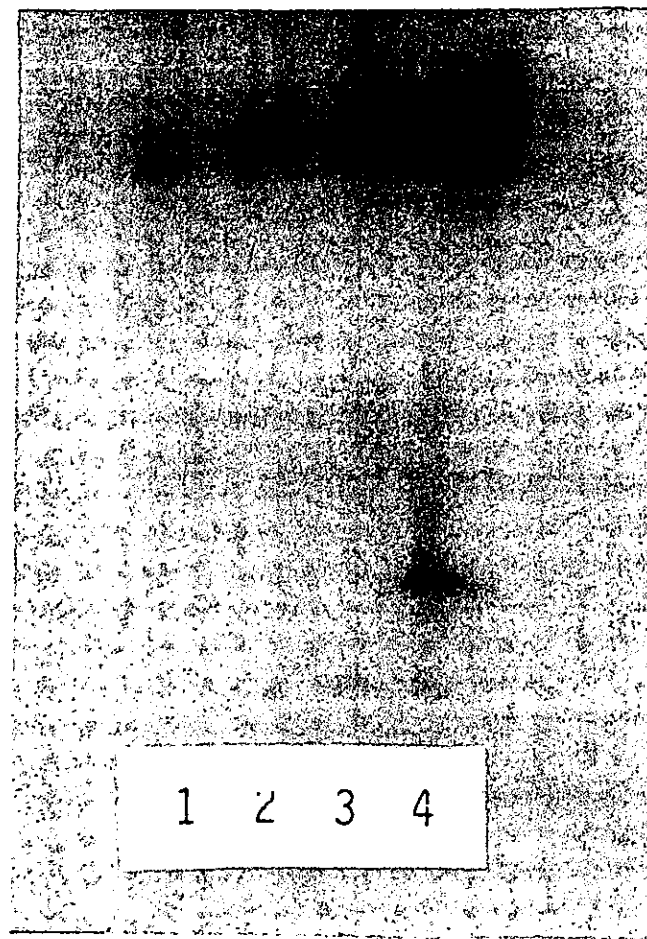


Figura R1. Se esquematizan los patrones de bandeo que se obtuvieron después de realizar electroforesis de acuerdo al procedimiento 5 de Material y Métodos. Se reveló la actividad de AIAox con azul rápido BB base de acuerdo a 9. Los extractos que se sembraron provinieron de plántulas que crecieron bajo la influencia de los tratamientos que se indicar. El tratamiento control (1) contuvo agua destilada. Los demás tratamientos consistieron de FG 1 mM (2), AIA (3) y AIB (4) a una concentración de 100  $\mu$ M. La intensidad de las bandas refleja el grado de actividad revelado en los geles. Todos los carriles contuvieron 150  $\mu$ g de proteína proveniente del extracto no fraccionado.

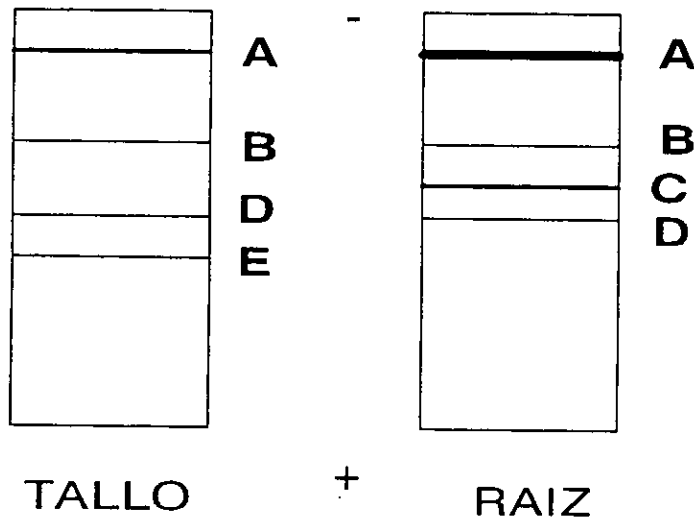
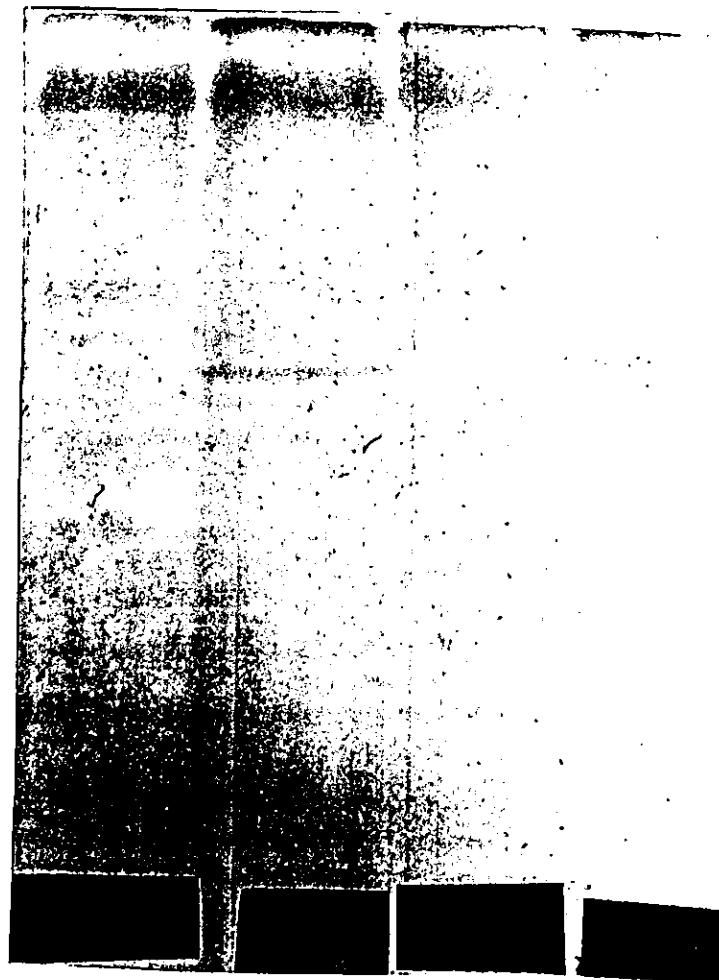


Figura R2. Bajo las mismas condiciones descritas en la figura R1, se revelaron los patrones de actividad de AIA oxidasa que aquí se esquematizan. Las muestras correspondieron ahora a extractos proteicos realizados a partir de tejidos de tallos o raíces de plantas control. La denominación de las bandas corresponde a su movilidad, de tal manera que la misma letra designa bandas de movilidad igual. El signo (-) representa el cátodo y el signo (+) el ánodo. La intensidad de las bandas corresponde a la intensidad del revelado en el gel.

Con el fin de evaluar si la mayor actividad rizogénica de los lotes tratados con ácido indolbutírico, podía ser explicada por la posible mayor estabilidad que presentara esta auxina a la oxidación por parte de las enzimas con actividad de oxidasa del AIA como lo han sugerido Mato, Rúa y Ferro (1988), se realizó en primer término un ensayo de la actividad de oxidación de un extracto de hipocotilos de frijol mungo registrando el AIA residual (tabla 5) mediante la técnica de Gordon y Weber (1951) y posteriormente, se midieron velocidades iniciales de consumo de oxígeno utilizando como sustrato oxidable las auxinas AIA y AIB, de acuerdo a Kokkinakis y Brooks (1979a), tanto para un sistema que contuvo peroxidasa de rábano tipo II (Sigma Chemicals), como para el extracto crudo de hipocotilos. Se variaron algunas condiciones, como la presencia de  $MnCl_2$  y diclorofenol (DCP), considerados cofactores de la AIA oxidasa, Peróxido de hidrógeno (PX), que de acuerdo a Kokkinakis y Brooks (1979b), es un factor necesario para esta actividad, y floroglucinol, que es un trihidroxifenol que promovió ligeramente la rizogénesis cabiendo la interpretación de que este efecto se debiera a su actuación como inhibidor de la actividad de AIA oxidasa. El registro de la auxina residual (tabla 5) no permite obtener una velocidad instantánea, dado que el período de incubación es de 5 min., mientras que el registro de la velocidad de consumo de oxígeno sí lo permite (tablas 6 y 7). La actividad de auxina oxidasa de la peroxidasa de rábano tipo II se muestra en la tabla 6 y la de los extractos obtenidos de plántulas de frijol mungo puede observarse en la tabla 7. Las condiciones de estos ensayos se detallan en el procedimiento 13 de material y métodos.

Dadas las interacciones entre las sustancias componentes del medio de reacción, el AIA y el reactivo de Salkowski, no resultó idóneo el método de Gordon y Weber (1951) para medir la actividad de AIAox.

En la tabla 5 se muestran los nanomoles de AIA residual, calculados a partir de la absorbencia a 525 nm, que reflejaron el contenido de AIA que se conservó sin oxidarse en el extracto crudo de hipocotilos de frijol mungo que contuvo 200  $\mu\text{g}$  de proteína, después de 5 min de incubación. Puede observarse en ésta, que en el ensayo 1 se conservan 32.45 nmoles de AIA residual mientras que en el ensayo 2 se conservan 13.59 nmoles. La única diferencia en la composición de ambos medios fue que en el último caso se adicionó peróxido, promoviendo éste la oxidación del AIA. El DCP demostró ser necesario para la reacción, según puede apreciarse en el ensayo 3, en el que el AIA residual fue de 34.54 nmoles y en el ensayo 1 (que contuvo DCP) fue de 32.45. En el ensayo 4, se encontraron 25.92 nmoles de AIA residual, que reflejan una actividad bastante menor al ensayo 2, ambos ensayos difirieron únicamente por la ausencia de DCP en el primero. La adición de FG no proporcionó resultados claros, ya que como puede observarse en el ensayo 5, cuando se agregó en lugar del DCP y en presencia de peróxido dio una lectura que se interpretó como 18.6 nmoles de AIA residual, y en ausencia de peróxido y presencia de DCP, quedaron 13.48 nmoles de AIA residual (ensayo 6), sugiriendo una degradación más intensa del mismo. En el ensayo 4 se puede apreciar que decreció la lectura del AIA residual en una mayor medida que el ensayo 1 que contuvo DCP, como si el peróxido estimulara más

eficientemente la oxidación del AIA. Esto puede deberse a una degradación peroxidativa, que podría ser analizada mediante los estudios de velocidad de consumo de oxígeno.

**TABLA 5**

<i>Ensayo</i>	<i>DCP</i>	<i>AIA</i>	<i>FG</i>	<i>Peróxido</i>	<i>nmoles de AIA residual</i>
1	+	+			32.45
2	+	+		+	13.59
3		+			34.54
4		+		+	25.92
5		+	+	+	18.6
6	+	+	+		13.48

AIA residual registrado por la técnica de Gordon y Weber (1951). Las concentraciones de los componentes adicionados fueron: Citrato 5 mM, DCP 120  $\mu$ M,  $MnCl_2$  200  $\mu$ M, AIA 300  $\mu$ M, FG 300  $\mu$ M,  $H_2O_2$  6  $\mu$ M, 200 $\mu$ g de Proteína. La concentración de AIA residual se estimó después de 5 minutos de incubación.

**TABLA 6**

<i>Ensayo</i>	<i>DCP</i>	<i>AIA</i>	<i>AIB</i>	<i>FG</i>	<i>Peróxido</i>	<i>nmoles de <math>O_2</math> <math>\mu</math>g peroxidasa<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup></i>
1	+	+				20.83
2	+	+			+	39.44
3		+				2.78
4		+			+	1.39
5		+		+	+	4.73
6	+	+		+		20.3
7	+		+			1.39
8	+		+		+	22.8
9		+	+			2.78
10			+		+	16.68
11	+		+	+		44.72
12	+			+	+	46.39

Velocidades iniciales de consumo de oxígeno por la peroxidasa de rábano tipo II, registradas polarográficamente en diferentes medios de reacción, de acuerdo al procedimiento 13. Las concentraciones de los componentes adicionados fueron: Citrato 5 mM, DCP 120  $\mu$ M,  $MnCl_2$  200  $\mu$ M, AIA 300  $\mu$ M, FG 300  $\mu$ M,  $H_2O_2$  6  $\mu$ M, 4 $\mu$ g de Peroxidasa de rábano tipo II. La concentración de AIA residual se estimó después de 5 minutos de incubación.



TABLA 7

<i>Ensayo</i>	<i>DCP</i>	<i>AIA</i>	<i>AIB</i>	<i>FG</i>	<i>Peróxido</i>	<i>nmoles de O<sub>2</sub> µg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup></i>
1	+	+				0.010
2	+	+			+	1.530
3		+				0.005
4		+			+	0.800
5		+		+	+	1.290
6	+	+		+		0.000
7	+		+			0.000
8	+		+		+	0.045
9		+	+			0.000
10			+		+	0.120
11	+		+	+		0.000
12	+			+	+	1.560

Velocidades iniciales de consumo de oxígeno del extracto crudo de hipocotilos de frijol mungo, registradas polarográficamente en diferentes medios de reacción, de acuerdo al procedimiento 13. Las concentraciones de los componentes adicionados fueron: Citrato 5 mM, DCP 120 µM, MnCl<sub>2</sub> 200 µM, AIA 300 µM, FG 300 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 µM, 4µg de Peroxidasa de rábano tipo II. La concentración de AIA residual se estimó después de 5 minutos de incubación.

Se pudo observar que el registro polarográfico fue el único método que permitió realizar un seguimiento continuo en el tiempo, de la oxidación del AIA, presentando además la ventaja de que en los casos que resultaron interferencias por parte de los componentes adiccionados al medio de reacción, pudo hacerse un registro control para observar la magnitud de tal efecto. Se calculó una estequiometría de 1 mol de AIA oxidado por un mol de O<sub>2</sub> consumido. Desafortunadamente, tampoco demostró ser un método idóneo, pues los registros del consumo de las mezclas preparadas no siempre permitieron interpretar claramente cuál de los componentes era oxidado; por otra parte, medir exclusivamente el consumo de oxígeno no proporcionaba información acerca de los productos que en cada condición se formaron. Para valorar este último aspecto, y así tener una imagen más integral del funcionamiento del sistema auxina-oxidasa, se realizaron los espectros de absorción, manejando las mismas variantes probadas para el registro polarográfico.

La tabla 6 resume los resultados obtenidos del registro polarográfico con la peroxidasa de rábano. La tabla 7 muestra los registros polarográficos obtenidos a partir del extracto de hipocotilos de frijol mungo.

La peroxidasa de rábano no fue capaz de degradar en forma importante al AIA si no existía en el medio diclorofenol(DCP), como puede notarse al comparar la línea 1 (20.83 nmoles de oxígeno consumido/ $\mu\text{g}$  proteína min) con la línea 3 (2.78 nmoles de oxígeno consumido/ $\mu\text{g}$  proteína min) de la tabla 6; también pueden compararse los espectros de absorción de las figuras R3a y R3c, en los que se comprueba que el AIA no pudo oxidarse aún en presencia de Px si en el medio no estaba presente el DCP, en cambio en la figura R3b se aprecia que el AIA se oxidó en presencia de este último compuesto. Cuando se utilizó extracto crudo en lugar de peroxidasa de rábano, se presentó una disminución del consumo de oxígeno en ausencia de DCP hasta aproximadamente la mitad (compárense los renglones 1 y 3 de la tabla 7 o los renglones 2 y 4 de la misma tabla). La presencia simultánea del DCP y  $\text{H}_2\text{O}_2$  produjo un decremento en la absorbencia en la región de los 280 nm y un aumento en la región de los 248 nm, que corresponde a la formación de derivados oxindólicos (figura 3d). La presencia de peróxido de hidrógeno en estas condiciones, acentúa la velocidad de consumo de oxígeno (ensayo 2 de las tablas 6 y 7), desapareciendo además el periodo de retardo observado en la oxidación del AIA (de acuerdo con lo reportado por Gaspar et al. 1982) (resultados no mostrados). La oxidación del AIB catalizada enzimáticamente (tanto por la Pxs de rábano como por el extracto) no pudo registrarse con el reactivo de Salkowski, pero mediante el registro polarográfico se demostró que el AIB se oxida a una velocidad bastante menor (tan sólo 2.94%) con respecto a la alcanzada con el AIA por el extracto crudo, registrándose una velocidad en presencia de DCP + peróxido de 0.045 nmoles de  $\text{O}_2$ , comparado con 1.53 nmoles que se registraron cuando en las mismas condiciones se oxidó AIA (ver tabla 7). También se observó una menor velocidad de consumo de oxígeno con el AIB como sustrato, al utilizar peroxidasa de rábano tipo II (ver

tabla 6); pero la diferencia no fue tan pronunciada como la observada en el extracto crudo. Se observó un consumo de 22.8 nmoles de  $O_2$   $\mu g$  de peroxidasa<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, cuando se oxidó AIB, correspondiendo a un 57.81% de la velocidad alcanzada al utilizar AIA como sustrato, que fue de 39.44 nmoles de  $O_2$   $\mu g$  de proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

La aplicación de floroglucinol (FG) redujo en proporción muy baja el consumo de oxígeno cuando el AIA fue el sustrato (compárense las líneas 1 y 6 de las tablas 6 y 7), pero llama la atención que cuando no hay AIA o AIB en el medio, y sólo en presencia de DCP, el FG se oxida intensamente (observar la línea 12 de las tablas 6 y 7), se demuestra así que es un sustrato oxidable para la peroxidasa de rábano tipo II, alcanzándose una velocidad de consumo de 46.39 nmoles de oxígeno consumido  $\mu g$  de proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, que fue la velocidad más alta que pudo registrarse entre los ensayos realizados (línea 12 de la tabla 6), además de observarse un incremento en la absorbencia entre los 230 y los 300 nm, que puede corresponder a la formación de quinonas que pudieron formarse al oxidar al FG como puede verse en la figura R4c.

Es notable que todos los tratamientos que contuvieron  $H_2O_2$  + DCP + AIA ó FG tuvieron una velocidad de consumo de oxígeno muy elevada (tratamientos 2 y 12 de las tablas 6 y 7) y cuando estuvo el AIB en lugar del AIA o del FG, se obtuvo una velocidad de oxidación razonablemente menor en los ensayos con peroxidasa y mucho menor cuando se ensayó el extracto crudo. De acuerdo con lo anterior, el FG no reemplaza la función del DCP, pero al parecer sí puede sustituir al sustrato oxidable, es evidente sin embargo, que el AIB presenta una dificultad importante para oxidarse, pero sorprendentemente, la oxidación de esta auxina no requiere de la presencia de DCP, en cambio sí es preciso que se agregue  $H_2O_2$  (comparar tratamientos 7 y 10 de las tablas 6 y 7). Es importante señalar que el AIB llega a ser oxidado por la Pxs de rábano, aunque mínimamente, mientras exista en el sistema AIA, aún en ausencia de DCP y peróxido (ver línea 9 de la tabla 6). Es de llamar la atención,

también, que en los ensayos conteniendo AIB + peróxido de hidrógeno, el consumo total de  $O_2$  fue menor que el registrado en la oxidación del AIA, interpretándose que cuando se vuelve limitante el peróxido agregado al medio de reacción, se interrumpe el consumo de  $O_2$  puesto que la reacción se detiene. Se fortalece esta interpretación al observarse que después de adiciones sucesivas de peróxido, se reactivó el consumo (resultados no mostrados). El ensayo que contuvo AIB, FG y DCP y que careció de peróxido y AIA presentó una velocidad de consumo de oxígeno  $44.72 \text{ nmoles } \mu\text{g}^{-1}$  de peroxidasa de rábano tipo II  $\text{min}^{-1}$ , que fue la segunda mayor velocidad registrada de la serie (línea 11 de la tabla 6) y alcanzó un valor muy semejante al que se obtuvo en la línea 12 de la misma tabla, con la mezcla FG + peróxido + DCP. Este alto consumo se consideró asociado a la oxidación del FG, porque no se observó el tipo de trazo obtenido con la oxidación del AIB.

Con la finalidad de incrementar la actividad observada en el extracto, se procedió de acuerdo a lo señalado en material y métodos (procedimiento 4) a concentrar la proteína del extracto. Con esta fracción enriquecida se realizó un conjunto de ensayos similares a los indicados en la tabla 7. Al realizar el registro polarográfico de la fracción enriquecida, la mayor diferencia observada con respecto al extracto crudo fue que la reacción transcurrió muy lentamente, en particular, en ausencia de peróxido, y que al aumentar la concentración de peróxido en lugar de consumirse oxígeno, éste aumentaba en el medio, tal vez como consecuencia de la presencia de catalasa en una mayor concentración, que contribuía a la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, en mayor proporción que lo observado en el extracto crudo.

Se obtuvieron registros de los espectros de absorción al tiempo cero y a los 5 minutos, utilizando peroxidasa de rábano tipo II, como sistema para establecer con mayor facilidad las mejores condiciones para la oxidación de las auxinas y las características de sus productos de oxidación. Los resultados se muestran en los registros de las figuras R3, R4 y R5. Los trazos A corresponden a los que se obtuvieron al tiempo cero y los trazos B fueron obtenidos después de 5 min de incubación a 30 °C. En la figura R3a se verificó que el AIA no se oxida en la ausencia de DCP y sí lo hace en su presencia (figura R3b). Al comparar la figuras R3c que fue obtenida en presencia de AIA + peróxido, con la figura R3b (AIA + DCP), se encontró que sin DCP, aún en presencia de peróxido, el AIA no se oxida. En la figura R3d se observa un incremento en la absorbencia sobre todo en la región próxima a los 248 nm, que se interpreta como la oxidación hacia derivados oxindólicos del AIA. En cambio, como se muestra en la figura R3b, si no se agrega H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al sistema, no se generan productos que absorban a 248 nm. En resumen, las figuras R3a, R3b, R3c y R3d muestran que el AIA puede oxidarse en presencia de DCP (en estas condiciones no se producen oxindoles); no puede oxidarse con la sólo adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y si se adicionan simultáneamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DCP, se producen oxindoles como resultado de la oxidación del AIA.

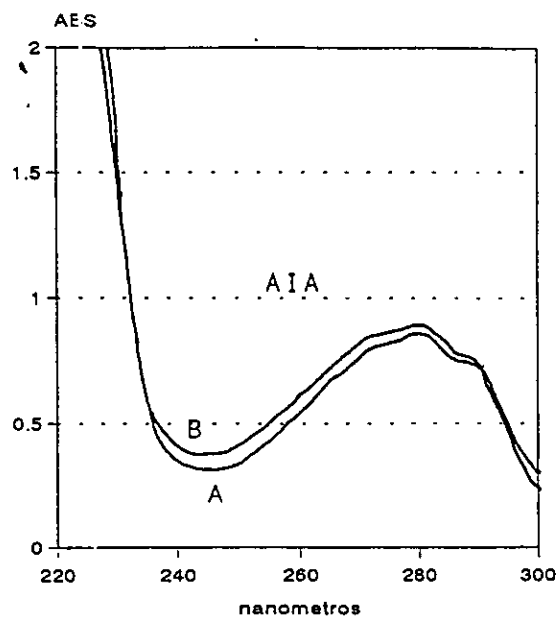
La figura R4a, muestra que en la presencia de AIA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + FG, no decrece la absorbencia en la región característica del grupo indol, como se pudo apreciar en la figura R3d, y existe un aumento en prácticamente todas las longitudes de onda analizadas. Se interpretó que este cambio implicó además de la oxidación del AIA, la del FG. Según se aprecia en la figura R4b, la ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio limita el incremento de absorbencia en el intervalo de longitudes de onda estudiado, interpretándose que el FG pudiera ser transformado en forma más eficiente mediante la actividad peroxidasa de la enzima. Se comprobó que el FG era transformado en estos ensayos, al excluir al AIA del medio (figura R4c). También se demostró, que la adición de DCP al sistema que contenía FG y AIA en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promovió la acumulación de sustancias que absorbieron a 248 nm, con la

concomitante disminución de la absorbencia en la región característica del grupo indol, reforzando la idea que el AIA se consume para generar productos oxindólicos, además de los productos de la oxidación y de la peroxidación formados a partir del FG (figura R4d).

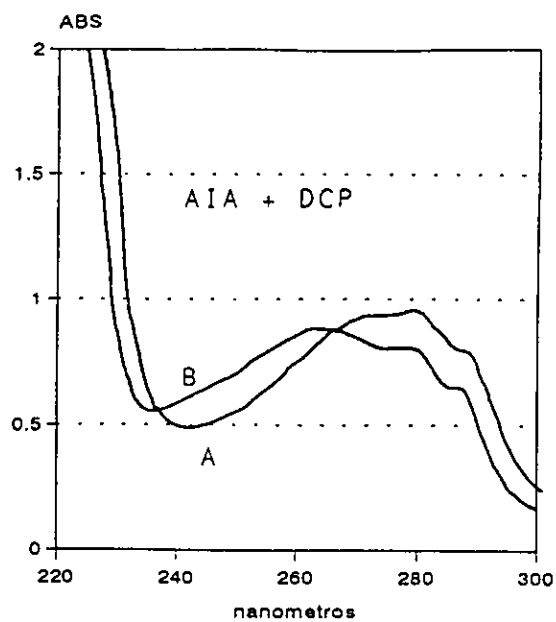
La comparación de las figuras R5a, R5b y R5c comprueba que el AIB pudo oxidarse más eficientemente, al adicionar DCP y peróxido, aunque a diferencia de la oxidación del AIA, con la sólo adición del DCP no se registró oxidación y en cambio si ocurrió con la adición de peróxido. En la figura R5d se observa un incremento en la absorbencia en mayor número de longitudes de onda que lo observado en la figura R5b, por lo que se puede interpretar que se esté oxidando el AIB (puesto que el medio contiene Px), además del FG (de acuerdo a lo que puede apreciarse en la figura R4c, se incrementa la absorbencia en ciertas longitudes de onda, que sumadas a los incrementos observados en la figura R5b, llevan a lo que se aprecia en la figura R5d).

Al comparar las figuras R5c y R5d, se comprueba que el FG disminuye el pico de absorbencia cercano a los 248 nm, correspondiente a los derivados oxindólicos; lo mismo puede apreciarse al comparar las figuras R3d y R4d. Estos resultados sugieren que el FG reduce la formación de derivados oxindólicos, este papel del FG coincide con el que se ha propuesto para los compuestos fenólicos en el trabajo de Grambow y Lagenbeck-Schwich (1983).

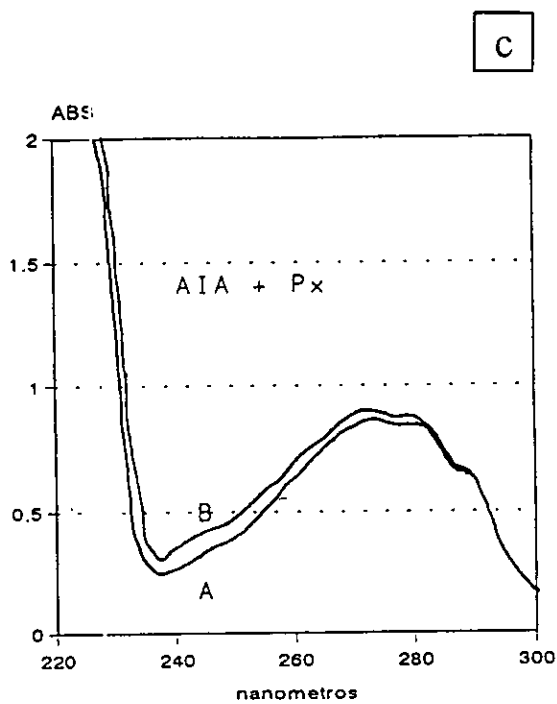
Los efectos que en general se observaron por parte del FG en los ensayos enzimáticos realizados *in vitro*, demuestran una función como agentes que obstruyen la oxidación del AIA, pero no parece ser el caso que esto ocurra como resultado de una



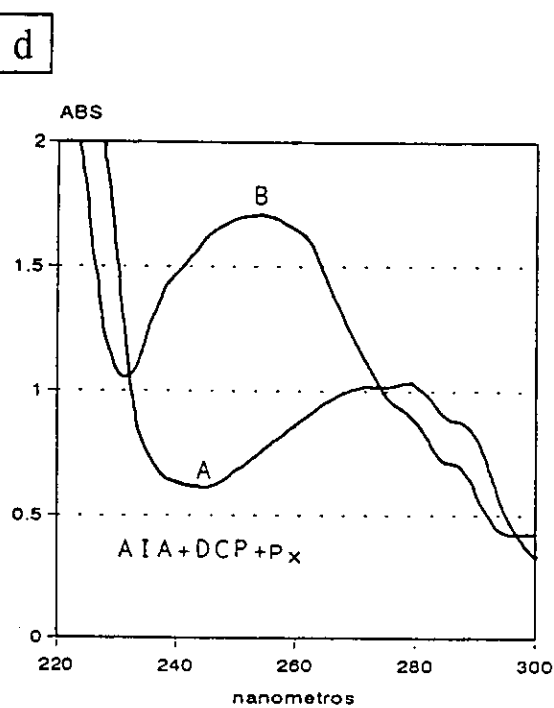
a



b

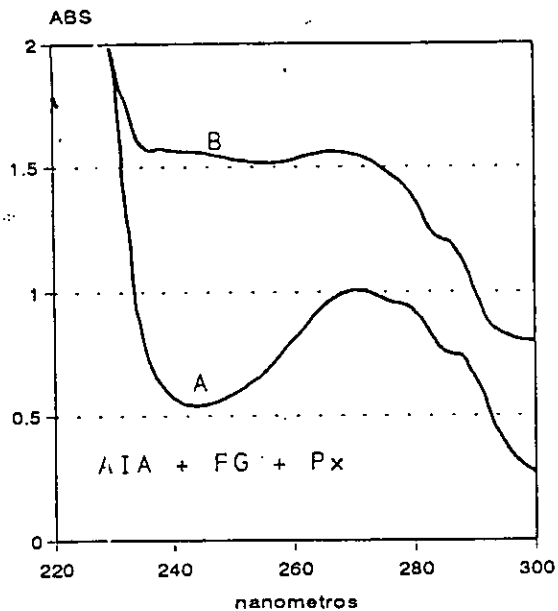


c

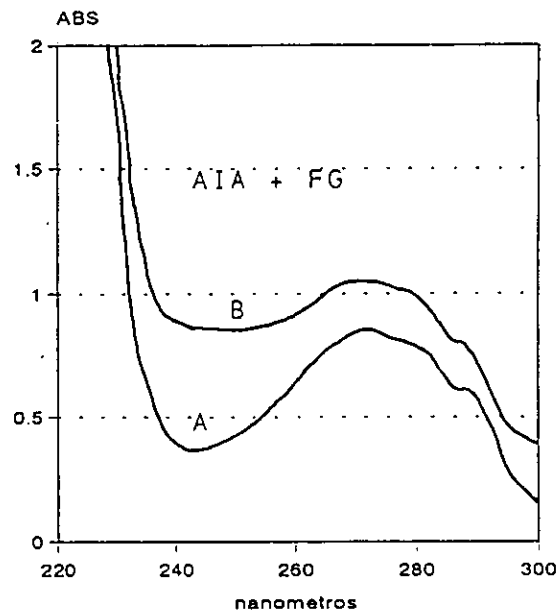


d

Figura R3. Se muestran los trazos obtenidos en 4 condiciones que se indican en cada uno de los casos representados (a, b, c y d). Las concentraciones empleadas de las sustancias adicionadas fueron: AIA 300  $\mu$ M, AIB 300  $\mu$ M, FG 300  $\mu$ M,  $H_2O_2$  6  $\mu$ M (Px), citrato 5 mM, DCP 120  $\mu$ M y  $MnCl_2$  5  $\mu$ M. Los trazos A corresponden al tiempo 0 y los B a 5 minutos. Se adicionaron 4  $\mu$ g de peroxidasa de rábano tipo II en todos los ensayos.

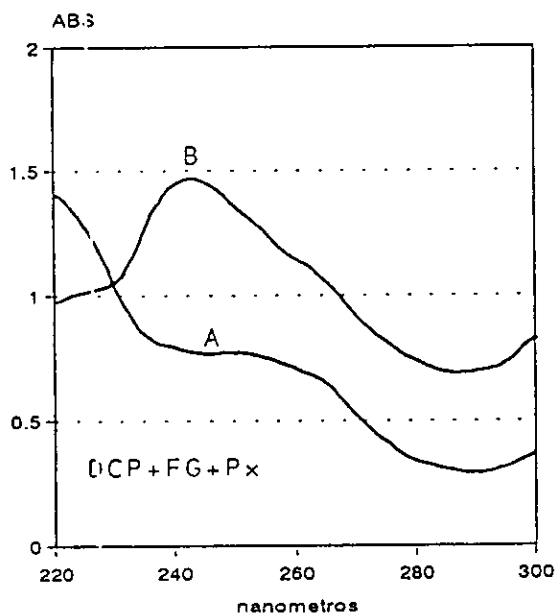


a



b

c



d

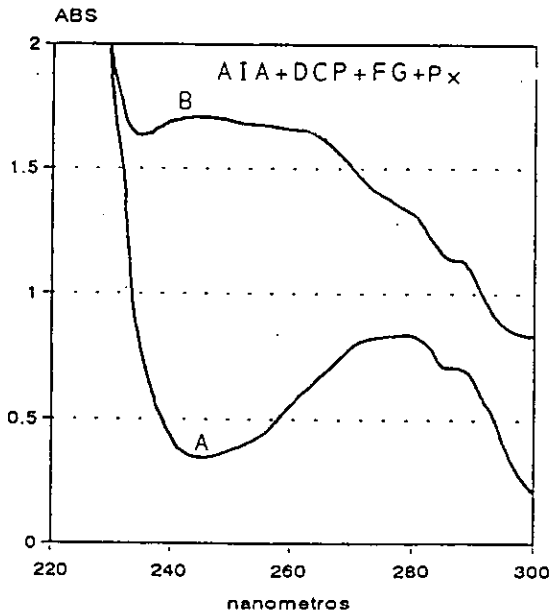
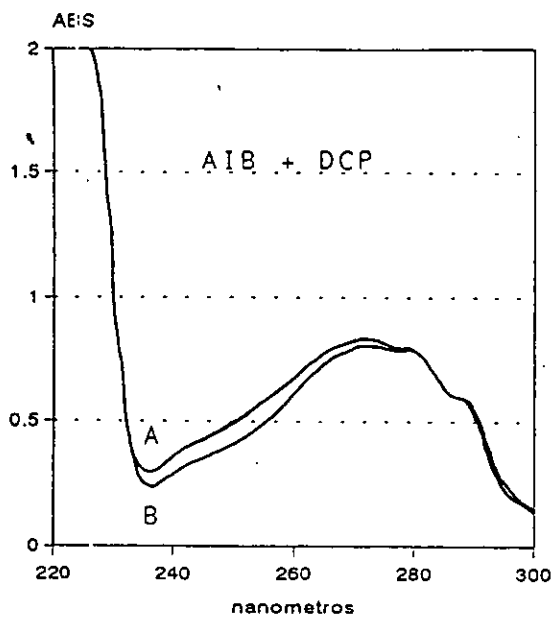
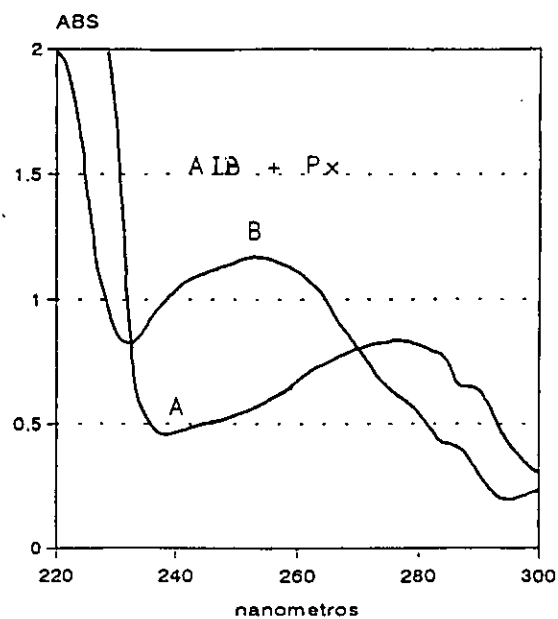


Figura R4. Se muestran los espectros de absorción entre los 220 y los 300 nm de diferentes mezclas preparadas como se indica en las gráficas a, b, c y d. Las concentraciones utilizadas fueron las mismas que se reportaron en la figura 3. Los trazos A corresponden al tiempo 0 y los B a 5 minutos. Se adicionaron 4  $\mu$ g de Peroxidasa de rábano tipo II en todos los ensayos.



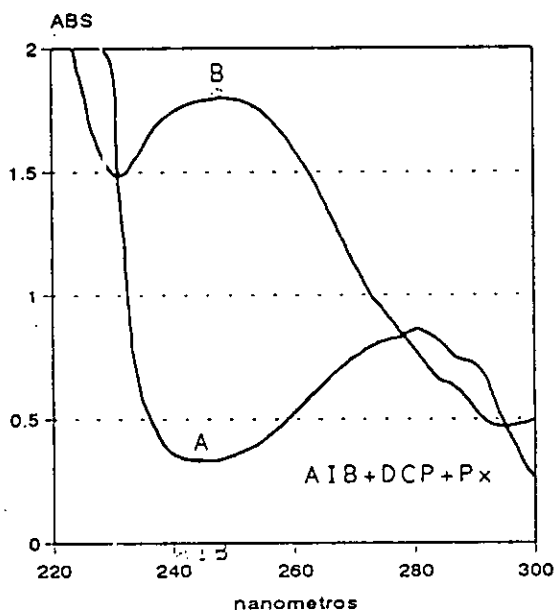


a



b

c



d

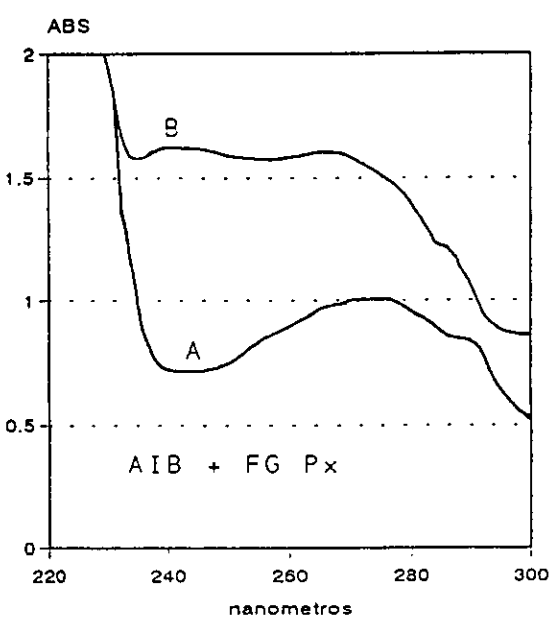


Figura R5. Se muestran 4 espectros de absorción que corresponden a los tratamientos que se indican como a, b, c y d. Los trazos A se realizaron al tiempo 0 y los B a los 5 minutos. Cada mezcla se incubó a 30°C y tuvo una composición igual a la indicada en la figura R3. Se adicionaron 4 µg de Pxs de rábano tipo II. El espectro de AIB sólo, no mostró diferencia entre los trazos A y B.

inhibición de la actividad de AIAox, como lo reportan Vázquez y Mato (1991) para ciertos compuestos fenólicos, sino más bien, por representar un sustrato que también puede ser oxidado, quitándole así al AIA la oportunidad de ser oxidado, es decir, actuando como antioxidante.

La disminución en la absorbencia en los 270, 280 y 290 nm, regiones características del grupo indol siempre fue interpretada como degradación del grupo indol y el aumento concomitante de absorbencia en la región cercana a los 248-251 nm se interpretó como formación de derivados oxindólicos.

Atendiendo a la dificultad que existió en la interpretación de lo que ocurría al aplicar los tratamientos al extracto crudo, probablemente debido a la composición múltiple de este extracto, y en vista del valor que tendría identificar las propiedades cinéticas de aquella isoenzima que modificó más importantemente su actividad al aplicar los tratamientos que estimularon la formación de raíces adventicias, así como establecer en qué fracción subcelular se localizaba esta isoenzima, se obtuvieron por separado extractos de tejidos de raíz y tallo y se cuantificó la actividad de AIAox (registro polarográfico) y peroxidasa (pxasa) (espectrofotométricamente) en ambos extractos; en la figura R6 se puede observar cómo en el extracto de la raíz, la actividad pxasa es de 3.5 veces mayor que la del tallo (27.13 unidades en raíz contra 7.6 en tallo) y la de AIAox es 7 veces mayor (1.76 nmoles de  $O_2$ . $\mu g$  proteína $^{-1}$ .min $^{-1}$  en raíz contra 0.25 nmoles en tallo). Las diferencias en estas proporciones son atribuibles a una composición distinta en el contenido enzimático de ambos tejidos, predominando en la raíz aquellas isoenzimas con mayor actividad de AIAox y pxasa.

Con el antecedente mencionado se procedió a obtener los patrones isoenzimáticos de pxasa y AIA-ox para los tejidos de raíz y tallo, encontrándose que tanto en la raíz como en el tallo, los patrones para ambas actividades difieren (como se muestra en las figuras R7A, B y C). Por otra parte, se observó que no todas las bandas con actividad de AIAox presentaron actividad de pxasa, como se aprecia en los registros cuantitativos que se prepararon a raíz de esta observación, descritos en las figuras R7A, R7B y R7C. En ellas se registraron: el AIA residual mediante la prueba de Salkowsky para la cuantificación de AIAox y el aumento de absorbencia a 430 nm, en presencia de o-dianisidina para la medición de la actividad de Pxasa. En ambos casos se utilizaron rebanadas de 4 mm, que fueron obtenidas después de realizar electroforesis de acuerdo al procedimiento 6 de Material y Métodos.

En las dos actividades reveladas fue interesante observar que de todas las isoenzimas la más activa en raíz era la más catiónica, esta misma isoenzima estuvo presente en el tallo, aunque no fue la más activa, como puede verse en las figuras R7A y R7B.

Al realizar un densitograma de las bandas reveladas en la raíz, se calculó que esta banda catiónica contribuyó con aproximadamente el 70% de la actividad de AIAox total. Al observarse que se trataba de la isoenzima más activa, se procedió a su fraccionamiento. Este se efectuó mediante una electroforesis preparativa, de acuerdo con el procedimiento 6 de Material y Métodos. Se estudió el grado de enriquecimiento de la fracción que contuvo a la isoenzima más activa mediante el corrimiento de electroforesis de cada fracción con actividad de AIAox, revelando tanto con Azul rápido BB base, como con Nitrato de Plata

(procedimientos 9 y 10), para establecer cuántas isoenzimas contenía la fracción correspondiente y cuántas bandas proteicas.

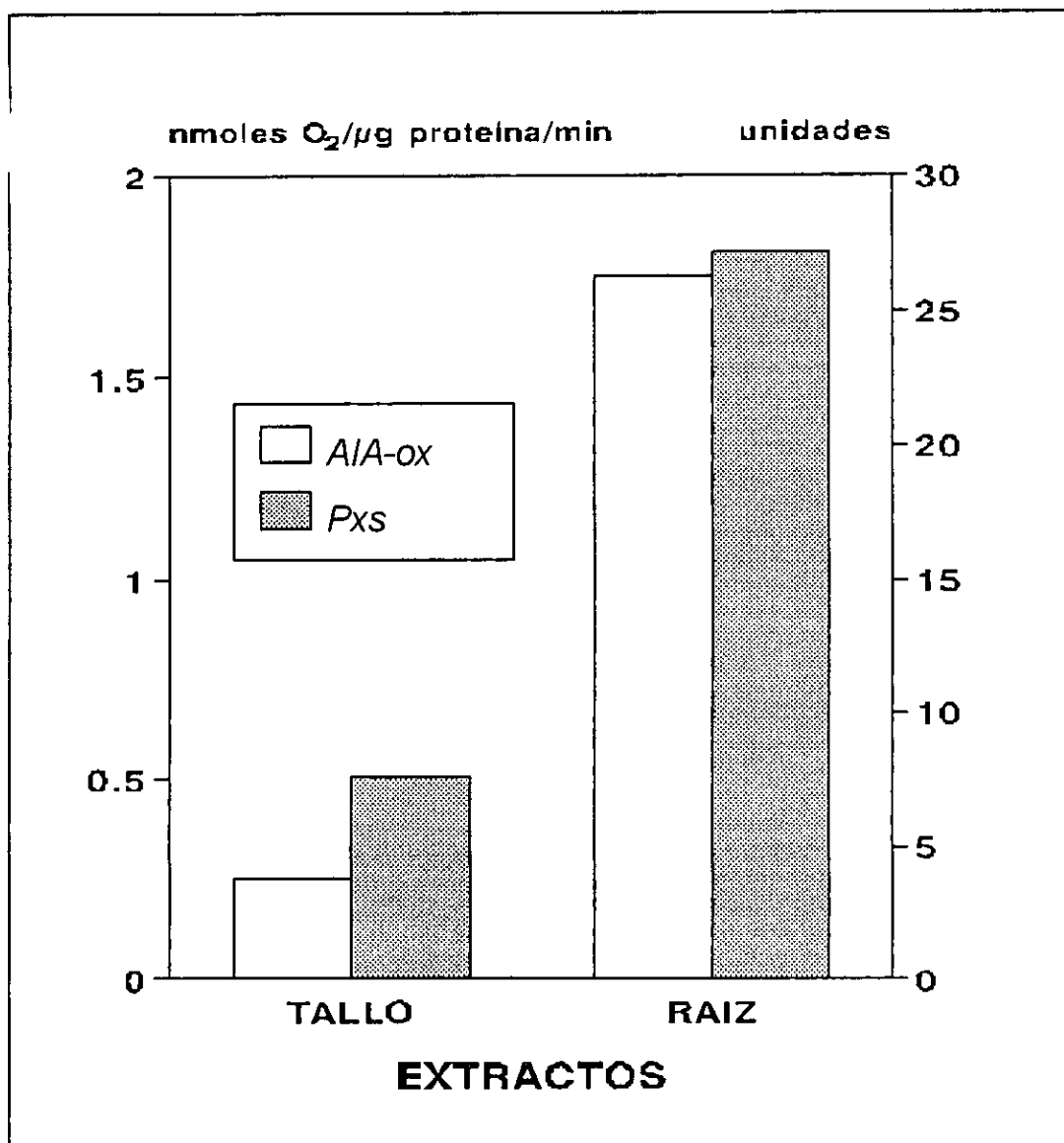


Figura R6. Se muestran las actividades de AIAox y Pxasa. Las condiciones de medición se describen en los procedimientos 13 y 14 de material y métodos. Se definió una unidad de actividad de peroxidasa como el cambio en 1 unidad de absorbencia a 430 nm, provocado por 1 mg de proteína por minuto.

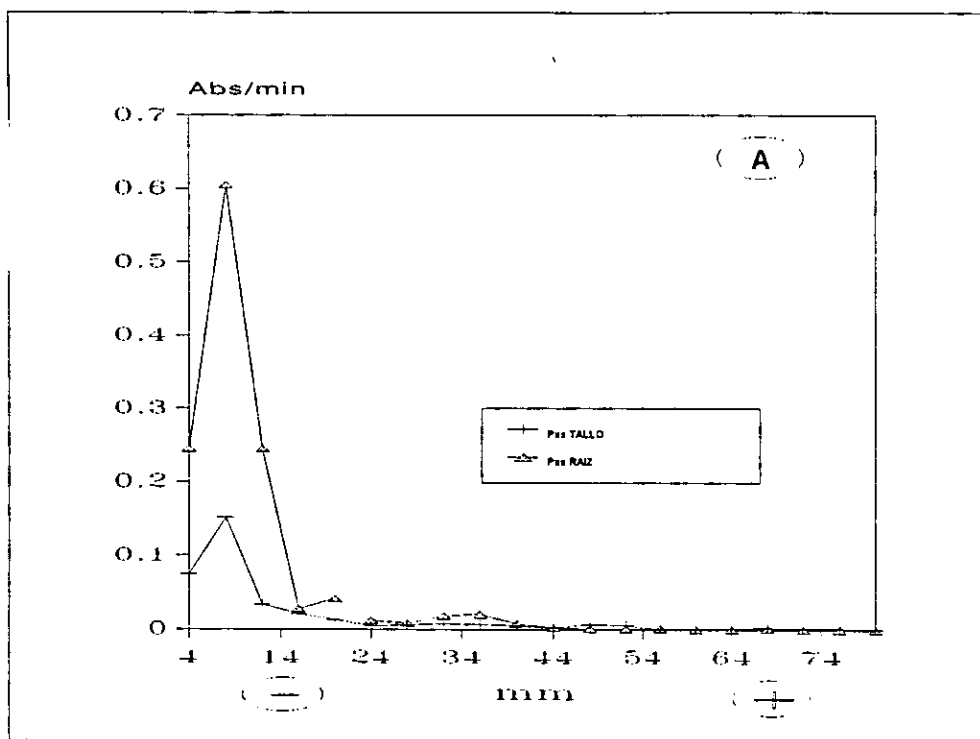


Figura R7A. Los perfiles se determinaron con 200  $\mu$ l eluidos a partir de segmentos de 4 mm que fueron tomados de un gel en el que se habia realizado electroforesis preparativa de acuerdo al procedimiento 6 de Material y Métodos. La actividad de Pxs se estimó por la reacción de o-dianisidina leyendo el cambio de absorbancia a 430 nm. Los signos + y - indican la polaridad del campo eléctrico en la electroforesis. Se representan las actividades isoperoxidasas registradas en raíz y tallo, conforme se avanzó en el gel desde el extremo que tuvo contacto con el cátodo hasta el que lo hizo con el ánodo.

Una vez que se dispuso de una fracción suficientemente pura de esta peroxidasa catiónica se procedió a establecer su localización celular. En la figura R8 se observan los densitogramas de muestras de protoplastos, digerido de pared y de la fracción enriquecida. La banda correspondiente a la peroxidasa catiónica se encontró en el digerido de pared celular y no se observó una banda con el mismo Rf en la muestra de protoplastos. Estos resultados sugieren que la peroxidasa catiónica se encuentra localizada en la pared celular. La localización de peroxidases catiónicas en el apoplasto en diferentes especies ya ha sido reportada (Ridge y Osborne, 1971; Gaspar et al, 1982; Goldberg, 1986; Zheng y Van

Huystee, 1992a; Brownleader et al, 1993), por lo que la peroxidasa que se aisló en el presente trabajo, se suma a las peroxidasas con esta localización.

Se procedió a caracterizar la peroxidasa catiónica, encontrando mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, una sola banda proteica de 40 KD de peso molecular, revelada con azul de Coomassie (figura R18). Por otro lado, se buscó calcular el valor de  $K_m$  para la enzima purificada, aunque no fue posible registrar suficiente actividad para valorar esta constante cinética. No obstante, dado que la mayor proporción de las actividades encontradas se debían a la presencia de la isoperoxidasa catiónica del apoplasto (PCA), se estimó en el concentrado proteico una "Km promedio". En realidad ésta no representa el comportamiento de una sola enzima, pero se consideró que este valor es significativo, si se atiende a que la PCA representó el 70% de la actividad de AIAox total. La  $K_m$  que se obtuvo para la actividad de AIAox fue de  $41.74\mu M$  y para la de AIBox de  $74.95\mu M$ . Estos valores fueron estimados a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk. Los valores de  $K_m$  encontrados para la oxidación de las auxinas caen dentro del rango que se esperaría, considerando las concentraciones de las auxinas ( $0.1-10\mu M$ ) *in vivo*; también tienen sentido a la luz de la  $K_d$  de la ABP 1 (auxin binding protein 1) para el AIA, que se reporta como  $4.75\mu M$  (Tian et al, 1995). En las figuras R9 y R10 se observan los gráficos de la linearización para estas actividades; aquí se distingue que la  $K_m$  para AIA-ox es casi la mitad del valor para AIB-ox, indicando mayor afinidad de la PCA por AIA sobre AIB.

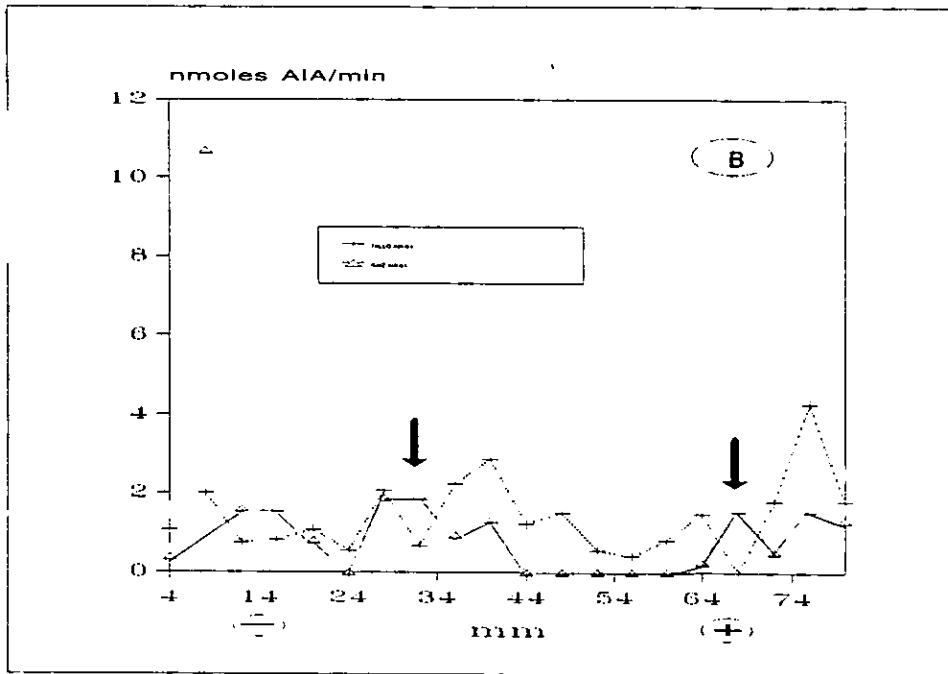


Figura R7B. La determinación de los perfiles de actividad se obtuvieron como se describió en la figura R7A, sólo que en lugar de registrarse la actividad de Pxs, se cuantificó la actividad de AIAox mediante la titulación del AIA residual con el reactivo de Salkowsky. Se muestran las isoenzimas con esta actividad a lo largo del gel desde el extremo que estuvo en contacto con el cátodo hasta el que estuvo próximo al ánodo. Las flechas indican las isoenzimas que se observan con actividad notable en la raíz y que en el tallo tienen una actividad despreciable o nula.

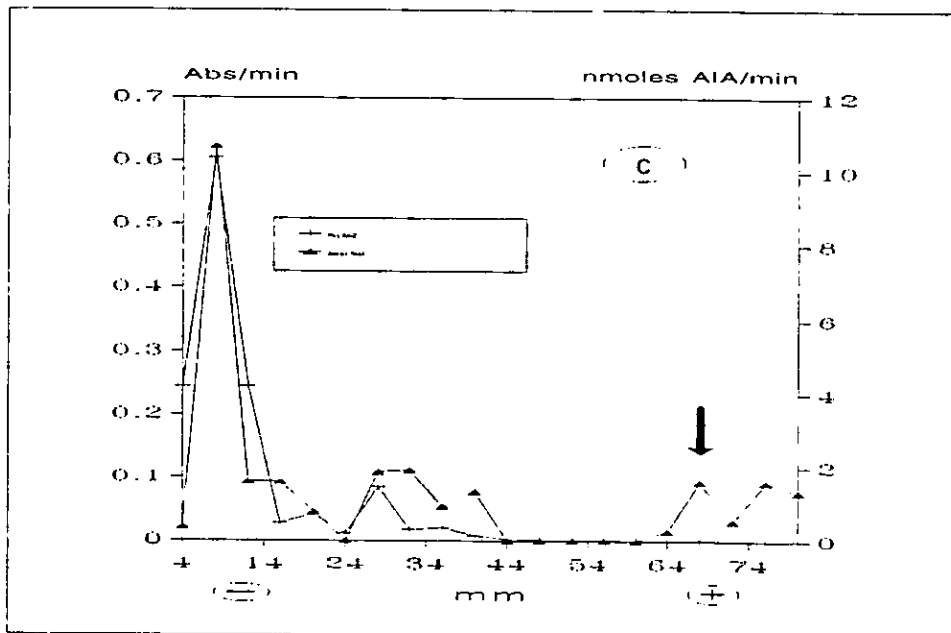


Figura F7C. Con fines comparativos, se reúnen los perfiles de AIAox y Pxs obtenidos para raíz. Se muestran las isoenzimas con estas actividades a lo largo del gel desde el extremo que estuvo en contacto con el cátodo hasta el que estuvo próximo al ánodo. Las flecha indica la isoenzima que mostró actividad de AIAox sin que se registrara actividad significativa de Pxs.

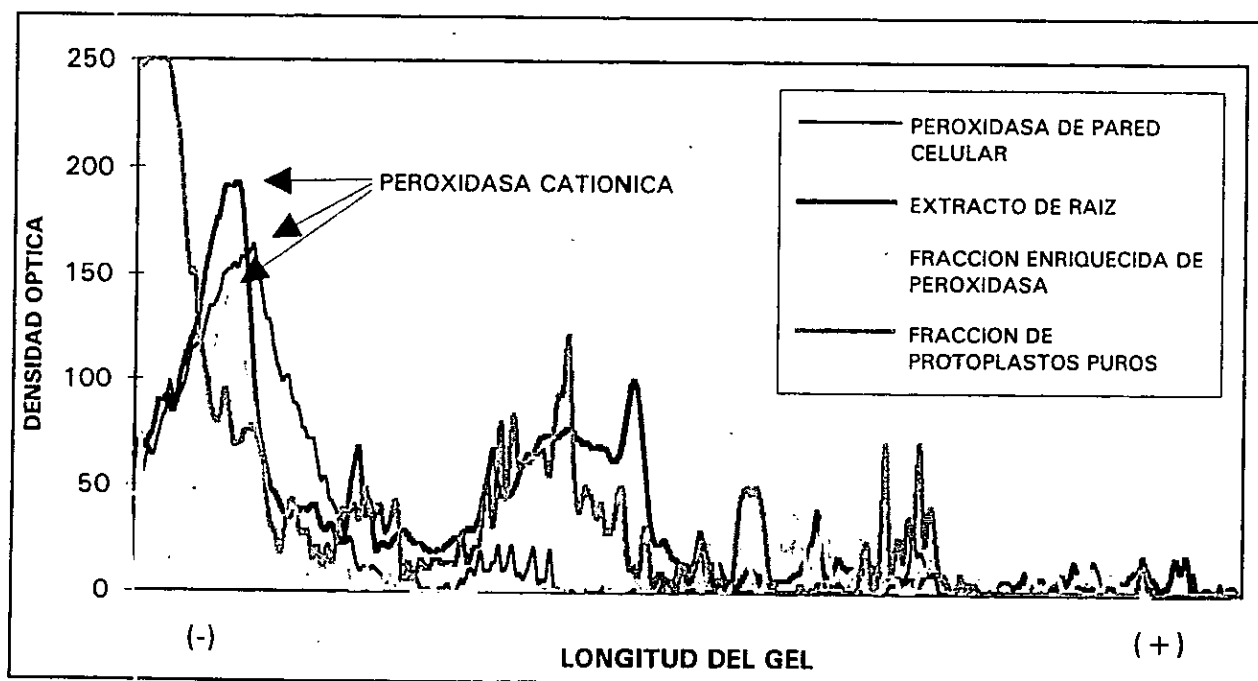


Figura R3. Se realizaron densitogramas con las muestras que se indican empleando un densitómetro Hoeffle. Se demuestra que la peroxidasa catiónica es la más abundante en el extracto de raíz, que en protoplastos no es la isoenzima más abundante, que en la fracción enriquecida de peroxidasa aumenta la proporción de esta actividad y que la fracción correspondiente a la banda de mayor actividad de la pared celular tiene un grado mínimo de contaminación con otras isoperoxidasas. Se reveló en el gel la actividad de AIAox como se indica en material y métodos. La "peroxidasa de pared celular" fue una fracción originalmente obtenida rebajando un primer gel de poliacrilamida, que se maceró para recuperar la peroxidasa y se volvió a correr electroforéticamente obteniéndose el densitograma que se muestra.



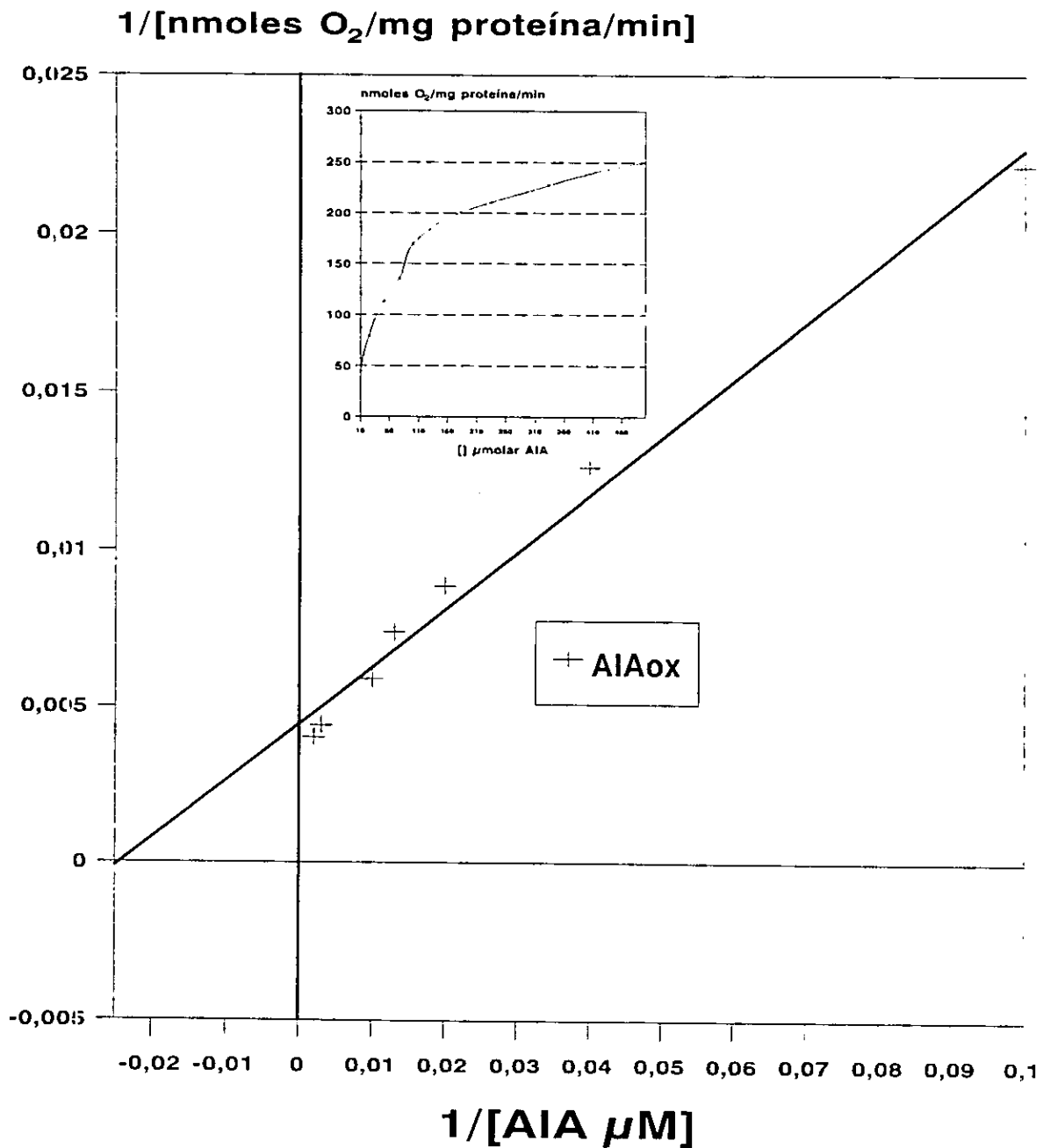


Figura R9. Se muestra la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad de AIAox obtenida de un concentrado proteico fraccionado con sulfato de amonio habiendo partido de raíces de frijol mungo. La estimación de la  $K_m$  que aquí se realizó, es en realidad un promedio de los valores de una mezcla de isoenzimas, en la que la actividad de la PCA representó el 70% de la actividad total. El valor de la  $K_m$  correspondió a 41.74  $\mu M$ .

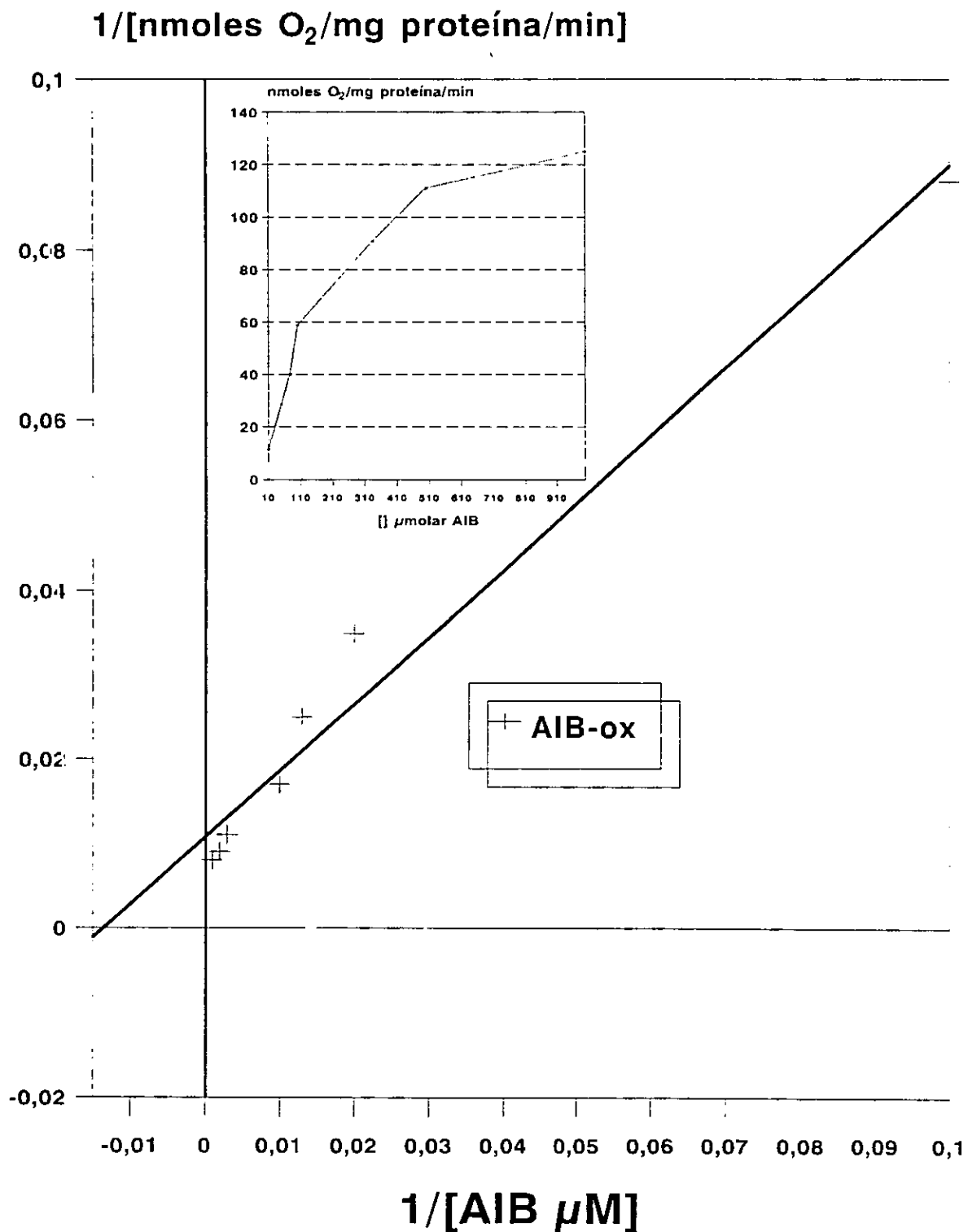


Figura R10. Se muestra la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad de AIBox. Dicha actividad fue medida polarográficamente en una fracción precipitada con sulfato de amonio, obtenida con el procedimiento señalado en la figura R9. El valor de  $K_m$  ( $74.95\mu M$ ) representa en realidad un promedio de los valores de una mezcla en la que la peroxidasa catiónica representa el 70% de actividad.

En la figura R11 se grafican los valores de actividad de AIA-ox y AIB-ox en un gradiente de pH. En esta gráfica se registraron los pHs óptimos (4.5 y 3.9 para AIA-ox y AIB-ox respectivamente). Estos valores no se alejan de los reportados por García-Florenciano et al (1992) quienes encuentran una actividad de AIAox óptima alrededor de pH 4 para las fracciones con actividad de peroxidasa obtenidas por cromatografía con Polivinilpirrolidona (PVPP) de extractos de *Vitis vinifera* cv. Gamay.

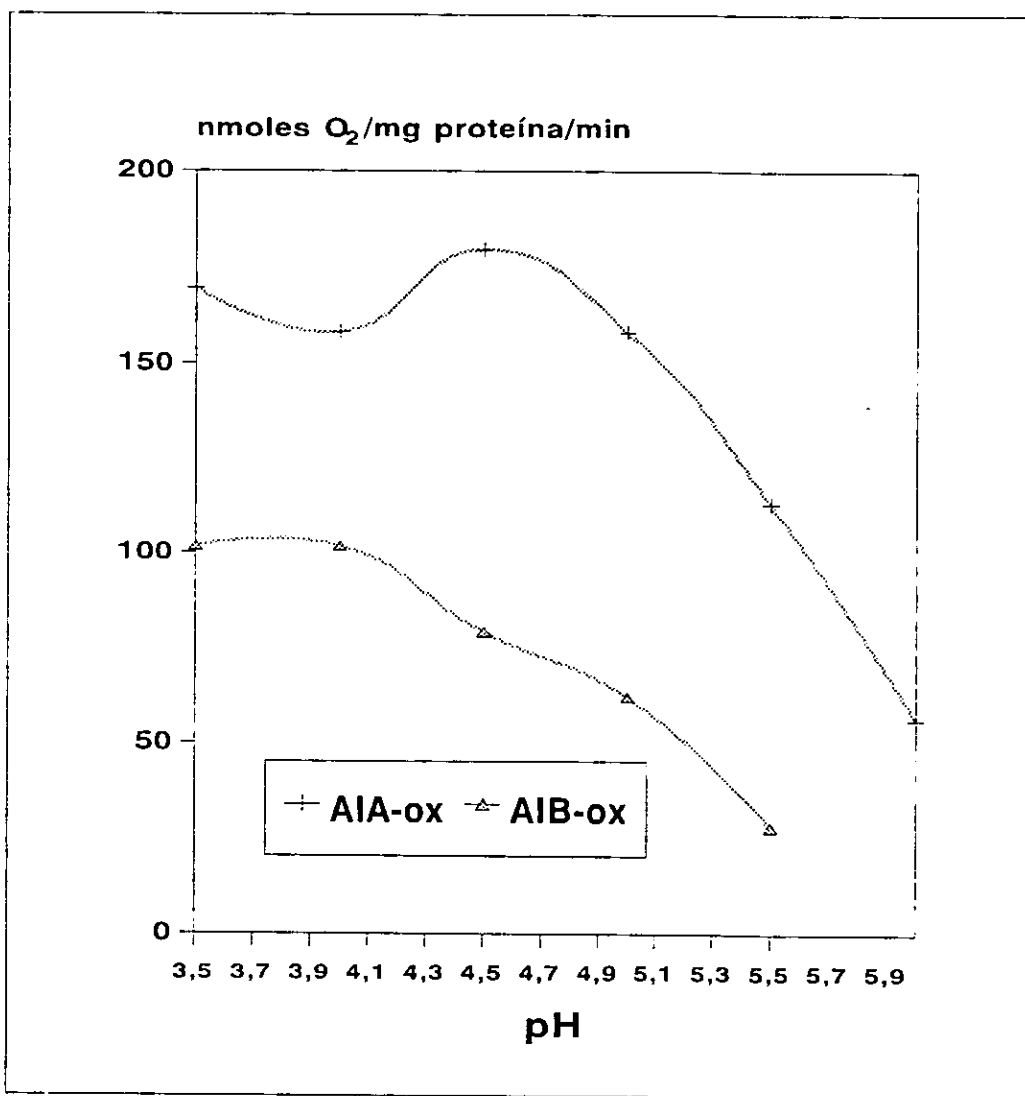


Figura R11. Óptimos de pH para las actividades de AIAox y AIBox. En ambos casos la actividad fue determinada por el consumo de oxígeno. Las muestras con los diferentes pHs se prepararon con buffer de citratos 30 mM, ajustando al pH deseado con adiciones de una solución de HCl 0.1N. El pH se determinó con un pHmetro Orion modelo 720.

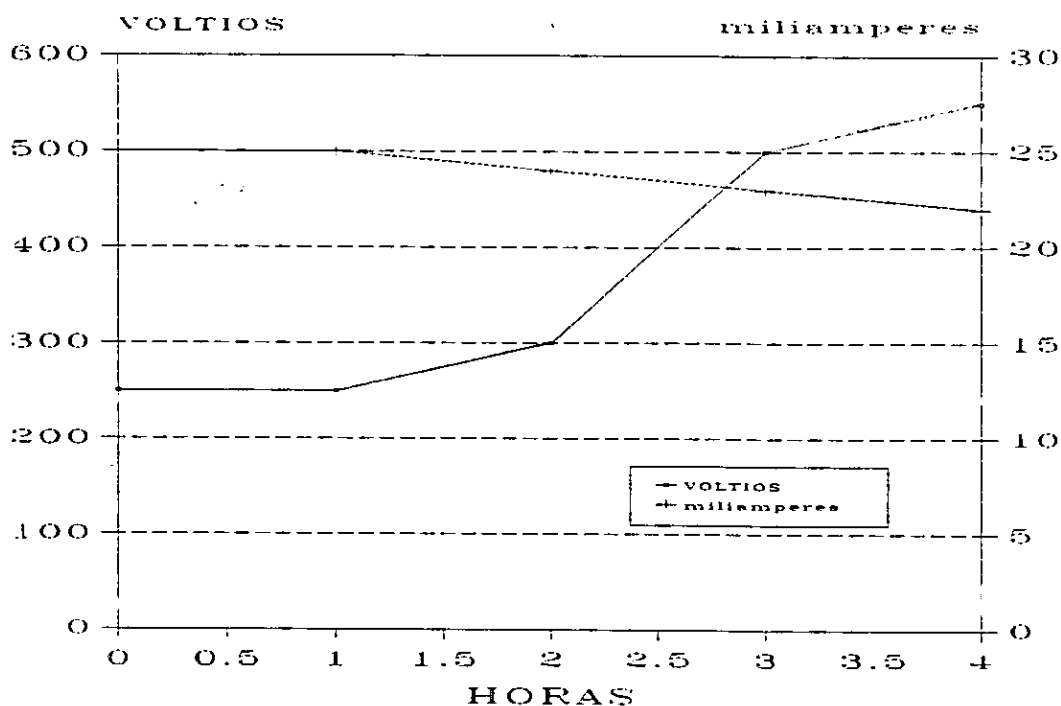


Figura R12. Se muestra la evolución en el tiempo del voltaje y la corriente, datos indispensables para determinar la finalización del electroenfoque. El electroenfoque fue realizado de acuerdo al procedimiento 15 descrito en Material y Métodos.

Alternativamente se procedió a la purificación de la PCA mediante fraccionamiento por electroenfoque de un extracto de raíz, los detalles de las condiciones del electroenfoque se especifican en el apartado de métodos. En la figura R12 se describe la evolución de las condiciones eléctricas del electroenfoque, notándose la tendencia del voltaje a ser constante y la disminución gradual de la corriente, indicando la estabilidad del gradiente formado y la finalización del mismo. Se separó el gradiente en 19 fracciones a las cuáles se les determinó el pH y la concentración de proteína. La figura R13 muestra el perfil de estos parámetros encontrándose grandes concentraciones de proteína en fracciones con pHs ácidos, Particularmente las fracciones 15, 17 y 18 con pHs de 5.15 , 4.43 y 4.02 respectivamente registraron las máximas concentraciones de proteína.

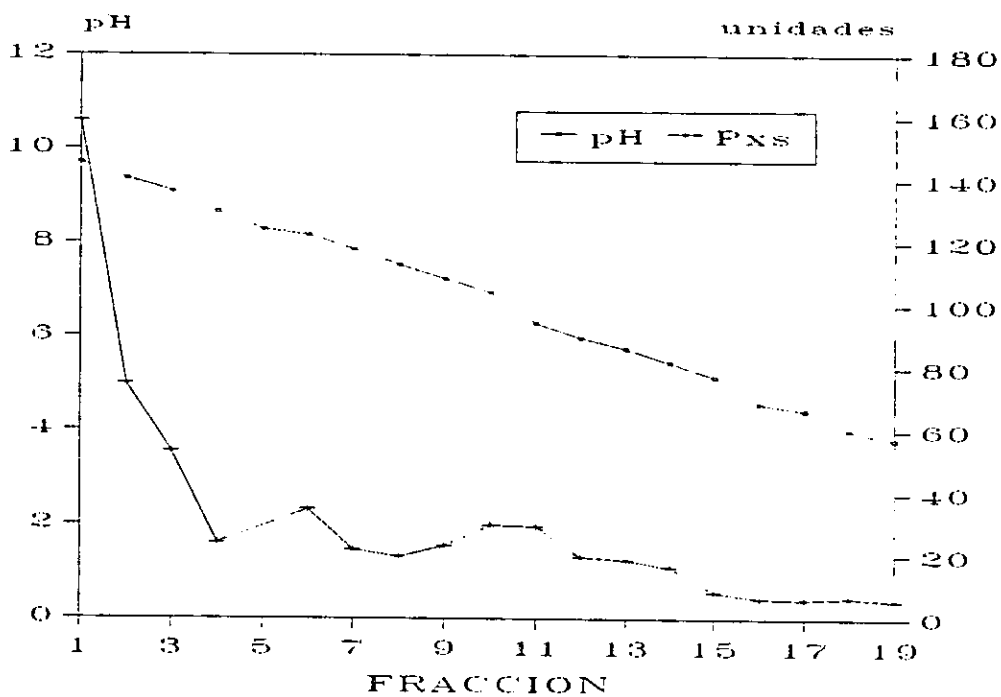
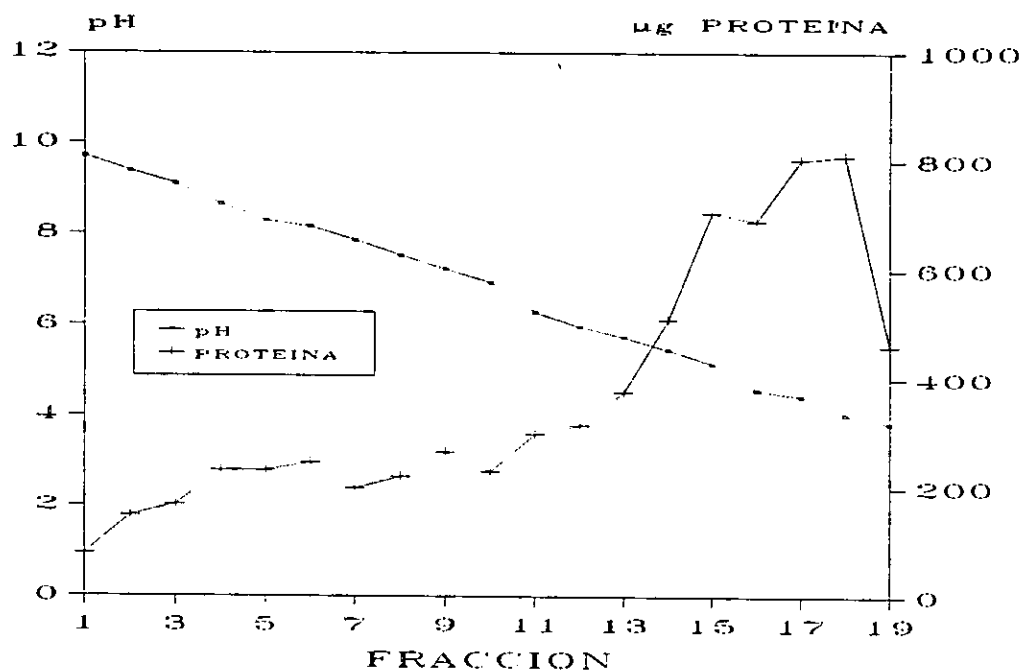


Figura E13. Perfil de actividad de Pxs y contenido proteico del extracto de raiz en el gradiente de pH formado en el electroforesis. Se definió unidad de Pxs como el cambio en 1 unidad de absorbencia a 430 nm provocado por 1 mg de proteína por minuto. Se midió el contenido de proteína con el método de Bradford. Puede observarse que el pH más ácido correspondió a las fracciones con mayor numeración.

Una vez ubicadas las fracciones con mayor actividad de Px se realizaron electroforesis para comprobar su pureza. La figura R14 refleja los patrones de isoperoxidasas de las fracciones 6, 9, 13, 15, 17, 18 y 19 del electroenfoque descrito en la figura R13, observándose que la fracción 6 es la que contiene más pura a la PCA (carril 1). Se realizó también la electroforesis de las fracciones 1 a la 10 del electroenfoque descrito en la figura R13, revelándolo para la actividad de AIA-ox y encontrando que la PCA no tiene isoenzimas contaminantes en las fracciones 1 a 7 (figura R15).

Mediante los registros anteriores pudieron seleccionarse las fracciones 1, 2 y 3 por tener la máxima pureza de la isoenzima catiónica de interés. Se estimó el PM, confirmándose un valor de 40 KD, que se había determinado previamente mediante la purificación de la proteína por la electroforesis preparativa. La imagen del gel obtenido para la estimación del PM se puede observar en la figura R16.

De los resultados anteriores es claro que la principal isoenzima con actividad de oxidasa del AIA tiene una localización en la pared celular, se le encuentra más concentrada en el tejido radical, es capaz de oxidar al AIB, presenta actividad de peroxidasa, su PM de 40 KD cae dentro del rango característico de las peroxidases (Gaspar et al, 1982; Gazaryan y Lagrini, 1996) que tiene un pH óptimo de 4.5 para la oxidación de AIA y 3.9 para el AIB y que por su ubicación es muy sugerente su participación en el control de la respuesta rizogénica. Resulta también interesante que los valores de Km de la AIAox se encuentren entre  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M (74.95  $\mu$ M para el AIB y de 41.76  $\mu$ M para el AIA) que corresponden con los valores de concentración límite para estimular la formación de raíces adventicias (considerando la concentración de la auxina exógena) y que el pH óptimo se aproxime a los valores que en solución acuosa tienen las auxinas. Es claro también que existe una mayor

afinidad por parte de esta enzima hacia el AIA, por lo que es de esperarse que el AIB sea más resistente a ser degradado por ésta. Sin embargo, la menor afinidad del AIB por sí sola, no explica la gran diferencia en actividad que se encuentra en este trabajo entre las auxinas que se ensayaron. La adición del floroglucinol, que actuó como antioxidante de las auxinas, de acuerdo con los resultados de este trabajo, no produjo una promoción comparable a la inducida por el AIB sobre la formación de raíces adventicias. El aumento en la concentración de AIA tampoco permitió obtener una promoción tan significativa.

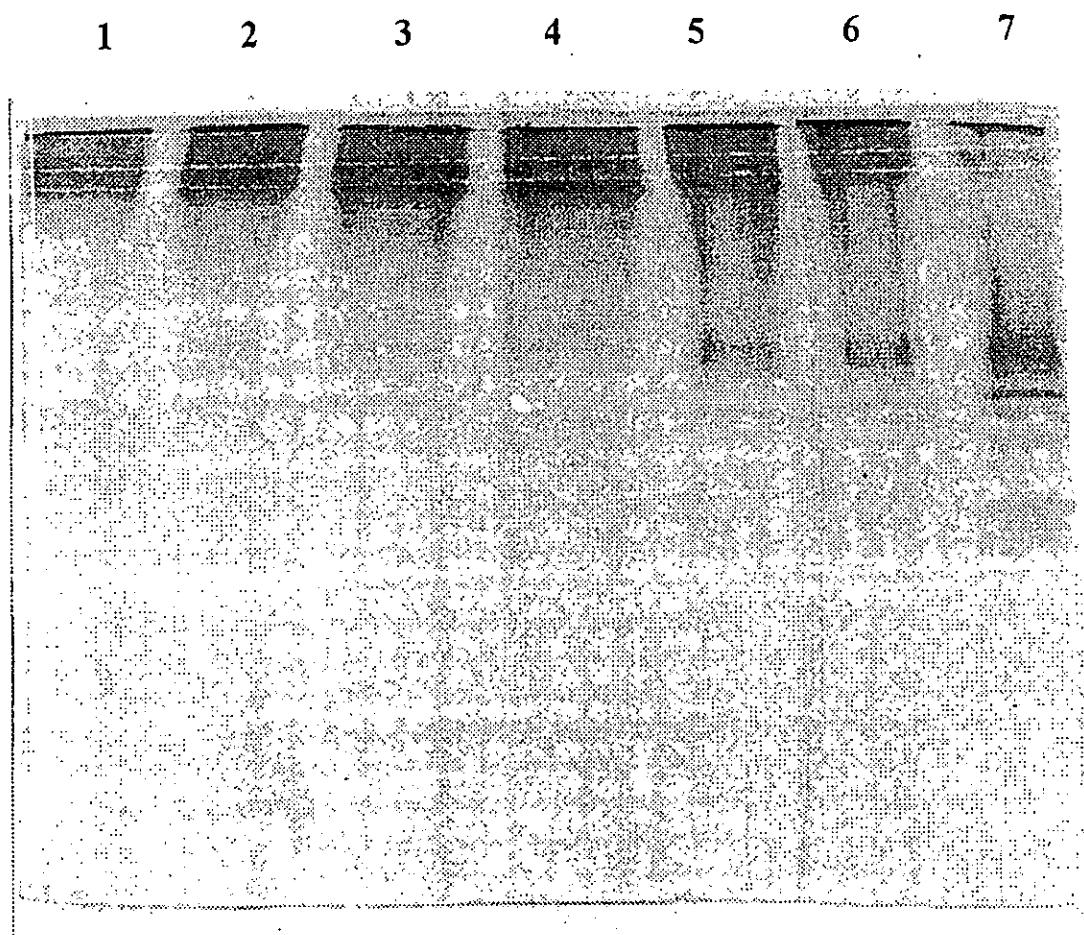


Figura R14. Se observa un barrido del gel revelado para observar bandas con actividad de peroxidasa. Se corrió la electroforesis de acuerdo al procedimiento 8. El gel fue revelado en un medio que contuvo bencidina 3.8 mM, peróxido de hidrógeno 45 mM y acetato de sodio 100 mM, pH 4.8. Puede notarse en el carril 1 que no se revelan isoperoxidasas contaminantes. En los demás carriles se revelan isoperoxidasas adicionales a la peroxidasa catiónica revelada en el carril 1. Se sembraron las fracciones obtenidas del isoelectroenfoque que contenían una mayor concentración de proteína (ver figura R13). Estas fueron las fracciones 6, 9, 13, 15, 17, 18 y 19, que fueron sembradas en los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. El cátodo se ubicó en la parte superior del gel.

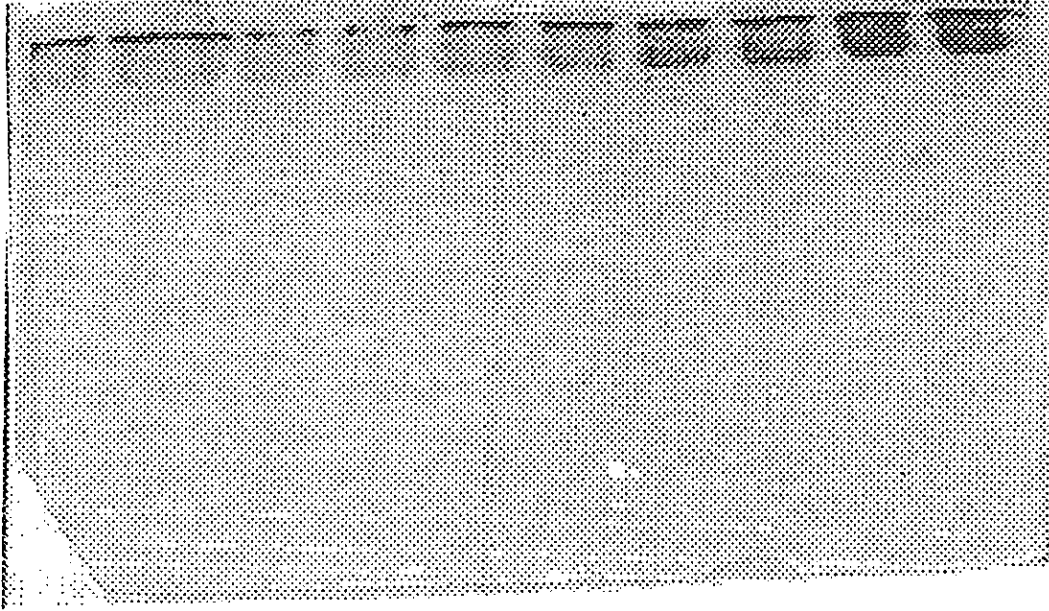


Figura R15. Se muestra un barrido de un gel revelado para AIAox de acuerdo al procedimiento 9, tomado de Talwar et al, 1985. Los carriles contuvieron las fracciones 1 a 10 que se ilustran en la figura R13. Se observa que se tiene purificada a la isoperoxidasa catiónica que presenta actividad de AIAox, al comprobarse que en los carriles 1 a 7 no hay más bandas.

Se investigó qué efecto provocaron el AIA, AIB y FG sobre la respiración en mitocondrias aisladas de frijol mungo (en vista de que estas sustancias promovieron la formación de raíces). También se investigaron los efectos sobre la formación de raíces adventicias de un inhibidor de la respiración mitocondrial antimicina, que inhibe el complejo II (Succinato deshidrogenasa), un inhibidor de la síntesis de ATP acoplada a la respiración y un inhibidor de la translocación del ADP (Antimicina, oligomicina y carboxiatractilósido). Al probar el efecto del FG, AIA y AIB sobre la respiración mitocondrial, se observó que el AIA inhibió este proceso de acuerdo a lo que se observa en la figura R17.

En la misma figura puede observarse que el AIB inhibió en más del 50% a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  y logró inhibir en mayor grado este proceso que el AIA, que de acuerdo con el gráfico, requeriría una concentración 50  $\mu\text{M}$  para lograr efectos similares. Debe destacarse que inmediatamente después de la adición de estas sustancias al medio de reacción, se observaron los efectos inhibitorios en el mismo grado que se presentaron cuando las mitocondrias fueron preincubadas en la presencia de las mismas. Esto sugiere que



no existe obstáculo para el transporte a través de la membrana de la mitocondria o que el efecto ejercido no implica la necesidad de que sean transportadas. Aunque no se muestran los resultados, el FG no tuvo ningún efecto sobre la velocidad inicial de consumo de oxígeno en las diferentes concentraciones en que fue administrado (que fueron las mismas que las de las auxinas aplicadas).

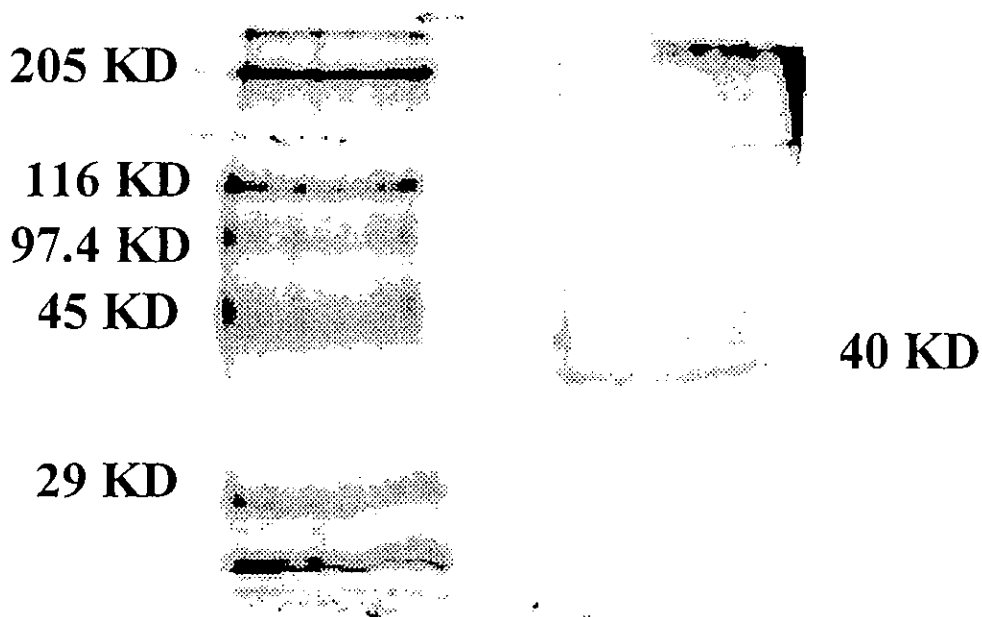


Figura F.16. Se muestra la imagen que permitió establecer que la PCA tuvo un PM de 40 KD. Las bandas del carril izquierdo corresponden a un kit para determinación de PM. Sigma MW-SDS-200. Se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de acuerdo al procedimiento reportado por Laemmli. Los marcadores de peso molecular fueron Miosina de conejo (205 KD), Galactosidasa de *E. coli* (116 KD); Fosforilasa B de músculo de conejo (97.4 KD); Albúmina de suero de bovino (66KD), albúmina de huevo (45 KD) y anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 KD).

Como ya se indicó, se investigó el efecto de la antimicina, la oligomicina y el carboxiatractilósido sobre la formación de raíces adventicias. Los resultados se muestran en

la figura R18. Llama poderosamente la atención la intensa estimulación lograda con todos los inhibidores de la respiración que se probaron, particularmente, que la oligomicina estimule en 64.54 % más que el AIB y que con respecto al control la antimicina estimule un 72.62%, el carboxiatractilósido un 85.71% y la oligomicina un 230.36%. Al resultar la oligomicina el mejor tratamiento de entre todos los realizados, se evaluó cuál podría ser la concentración más efectiva para la formación de raíces laterales, y según puede observarse en la figura 19, la concentración originalmente probada (1  $\mu\text{g/ml}$ ) fue la mejor. Dicha concentración no se expresa en  $\mu\text{moles/ml}$ , por proceder de una mezcla de oligomicinas de diferente PM.

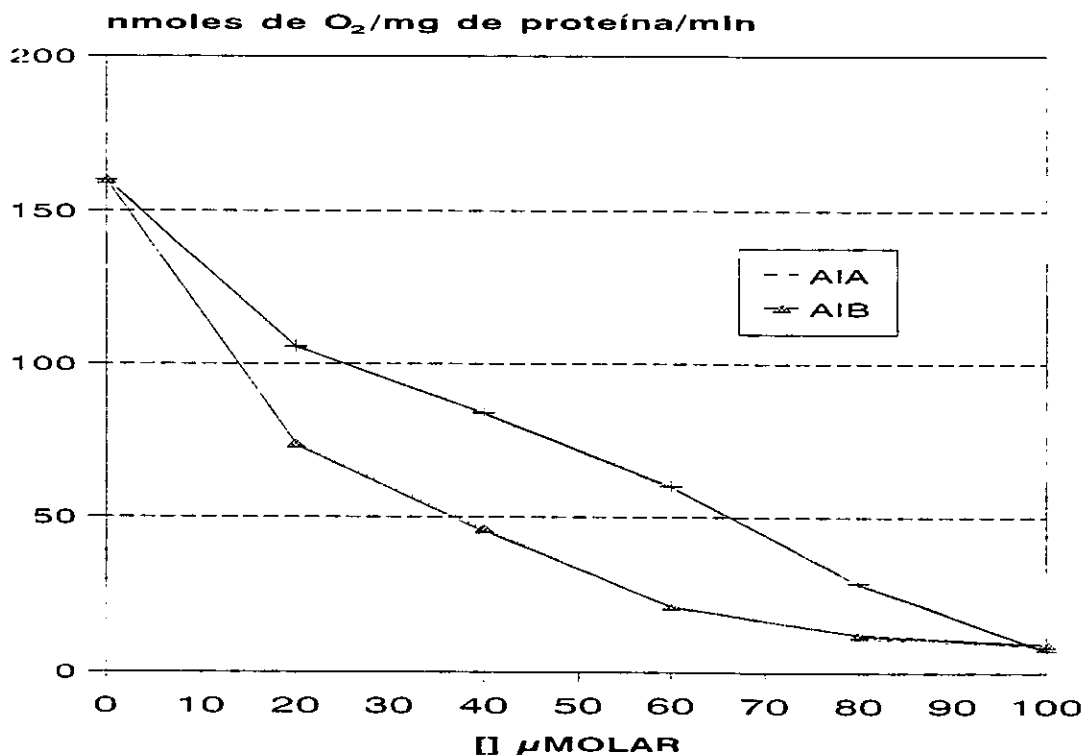
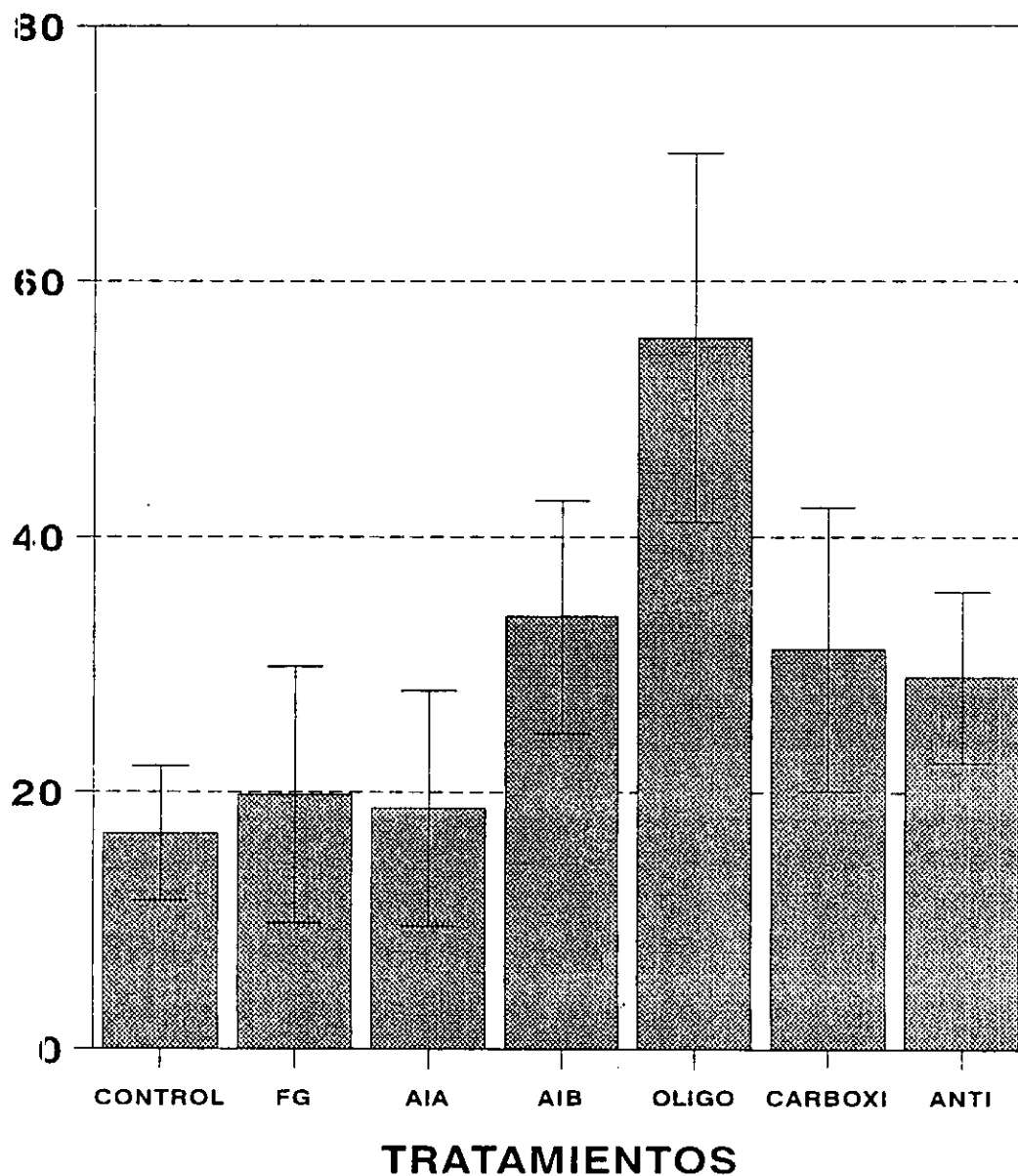


Figura R17. Se muestra el comportamiento de la respiración mitocondrial ante la aplicación de concentraciones crecientes de AIA y AIB. La composición del medio de reacción se indica en Material y Métodos (procedimiento 18). La actividad respiratoria se reporta por mg de proteína mitocondrial que fue estimada con el reactivo de Bradford. Las mitocondrias fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento 18.

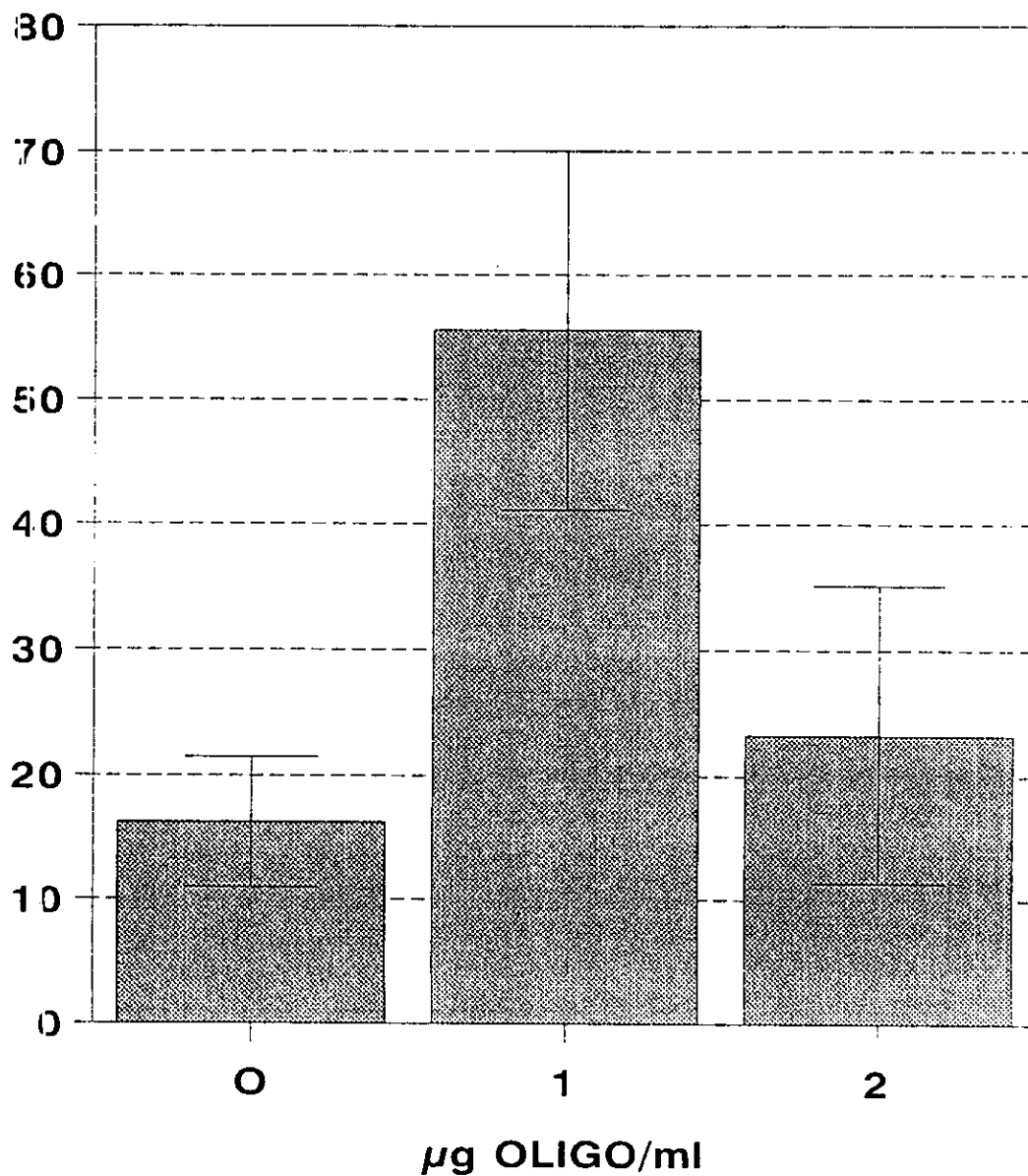
## RAICES/HIPOCOTILO



Tratamiento	Control	FG 100 $\mu$ M	AIA 100 $\mu$ M	AIB 100 $\mu$ M	Olig. 1 $\mu$ g/ml	Carb. at. 5 $\mu$ M	Antimicina 1 $\mu$ M
raíces/hipoc.	16.8 $\pm$ 5.23	19.82 $\pm$ 9.99	18.75 $\pm$ 9.17	33.73 $\pm$ 9.16	55.5 $\pm$ 14.44	31.2 $\pm$ 11.12	29.0 $\pm$ 6.71

Figura F18. Se representan mediante barras las respuestas que en cuanto a número de raíces por estaca se obtuvieron en segmentos de plántulas de frijol mungo después de 24 hs de tratamiento con las concentraciones indicadas en el cuadro, en el que también se expresan los valores promedio  $\pm$  la desviación standard de las raíces formadas en lotes que constaron de 30 plántulas. Las plántulas etioladas se mantuvieron todo el tiempo en la obscuridad.

## RAICES/HIPOCOTILO



µg oligomicina/ml	0	1	2
Raíces/estaca	16.23±5.23	55.5±14.44	23.23±11.86

Figura R19. Se representan las respuestas de enraizamiento de hipocotilos de frijol mungo tratados con 3 concentraciones del inhibidor de la ATP sintetasa mitocondrial oligomicina. Las concentraciones del inhibidor se señalan en el recuadro. La respuesta rizogénica es una media calculada para una población de 30 segmentos en cada tratamiento.

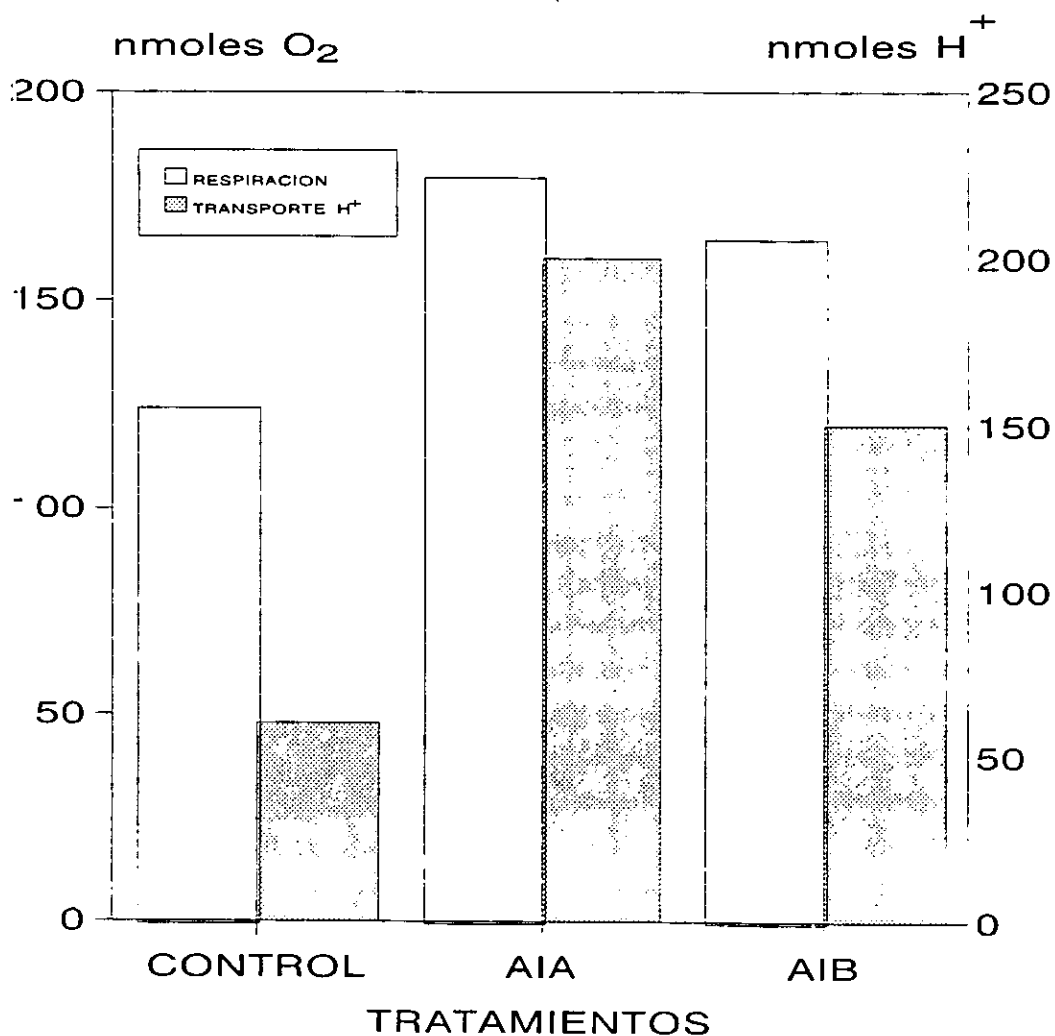


Figura R20. Se muestran las velocidades iniciales (en nanomoles de O<sub>2</sub> /200  $\mu$ l de protoplastos por minuto) de consumo de O<sub>2</sub> en protoplastos aislados de frijol mungo en tres condiciones: La condición control correspondió a la incubación de los protoplastos en un medio de reacción conteniendo: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200  $\mu$ M, KNO<sub>3</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 mM y manitol 0.6 M con pH 5.8 (ajustado con KOH). Los tratamientos con AIA o AIB se realizaron adicionando al medio control, una concentración final 50  $\mu$ M de auxina. Se muestran también las velocidades iniciales de cambio en la concentración molar de H<sup>+</sup> en nanomoles/200  $\mu$ l de protoplastos por min.

La concentración de oligomicina que resulta efectiva en la inhibición de la ATP sintetasa mitocondrial, es de 400 ng mg<sup>-1</sup> de proteína de partículas submitocondriales (Ramakrishna y Rao, 1976). En 120 g de tejido fresco se obtienen 15 mg de proteína de partículas submitocondriales, lo que implica que se requiera alrededor de 6  $\mu$ g de oligomicina para

afectar a 120 g de tejido, considerando que la oligomicina puede llegar libremente a las mitocondrias para ejercer su efecto..

Como consecuencia del efecto de los inhibidores de la respiración se consideró que podría afectarse la concentración de cationes en el citosol, para lo cual se buscó determinar la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ . No se pudo determinar la concentración en el citosol, porque no se dispuso de un método confiable que midiera estos iones exclusivamente en el citosol. Alternativamente, se estudió el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  en mitocondrias aisladas que fueron tratadas con AIA y AIB, en comparación con un tratamiento control sin auxinas, como una aproximación indirecta para estudiar la posible variación en los contenidos de iones más importantes en el citosol.

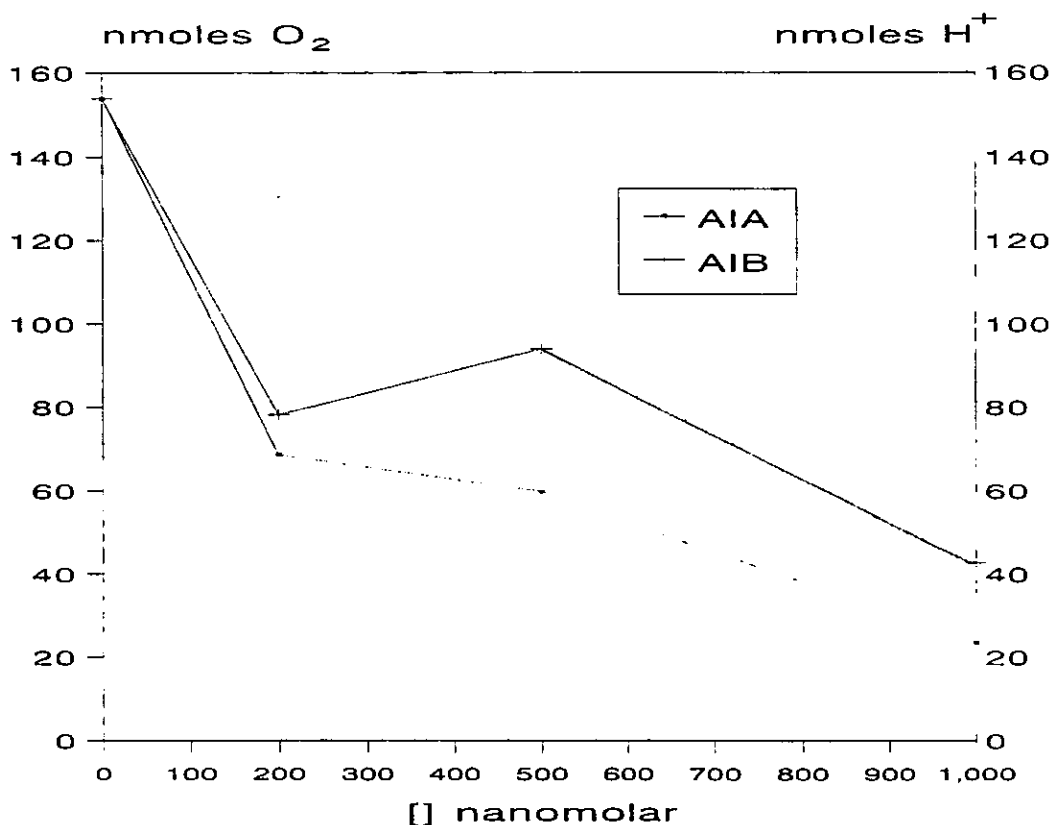


Figura R21. Efecto de la concentración de auxinas sobre la velocidad inicial de cambio en la concentración de  $\text{H}^+$  en el medio de reacción conteniendo mitocondrias aisladas de frijol mungo. La composición del medio de reacción fue la misma que el empleado en la medición de la respiración mitocondrial. Se administraron 3 concentraciones (200 nM, 500 nM y 1 000 nM) de AIA o AIB.

En la figura R21 se muestran los efectos del AIA y el AIB sobre la velocidad de cambio en la concentración de protones. Se observó en general una disminución en la velocidad de expulsión de protones, que es consecuente con la inhibición provocada en la respiración mitocondrial, aunque el AIA provocó un descenso más pronunciado que el AIB.

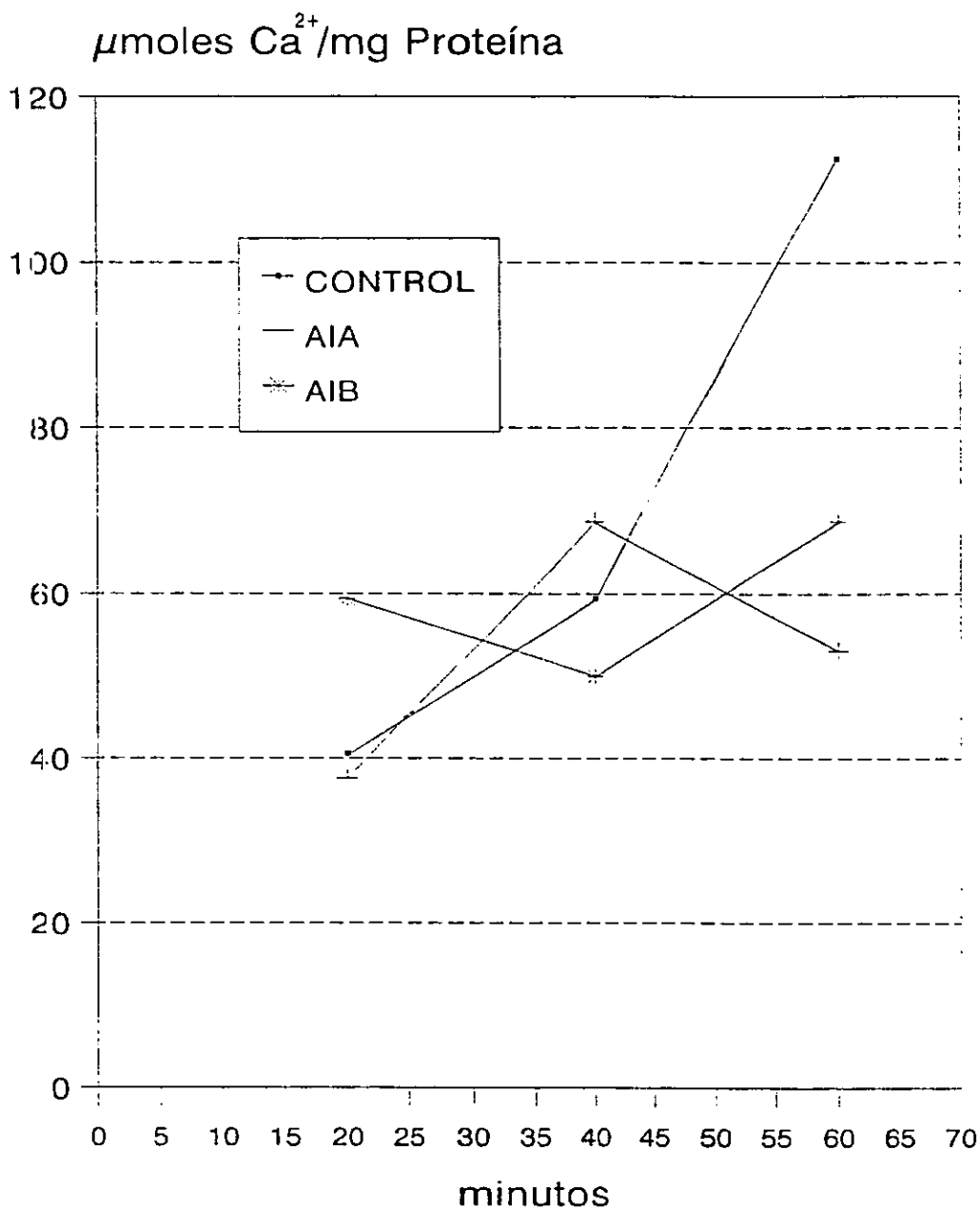


Figura R22 Se muestran los micromoles de iones calcio en mitocondrias que fueron incubadas en presencia de AIA o AIB, o en su ausencia (tratamiento control). La composición del medio se describe en material y métodos. Las concentraciones finales de AIA y AIB correspondieron a 50  $\mu\text{M}$ . Se interrumpió la incubación a los 20, 40 y 60 min, sedimentando las mitocondrias y digiriendo con ácido nítrico para medir por espectroscopia de absorción atómica el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ .

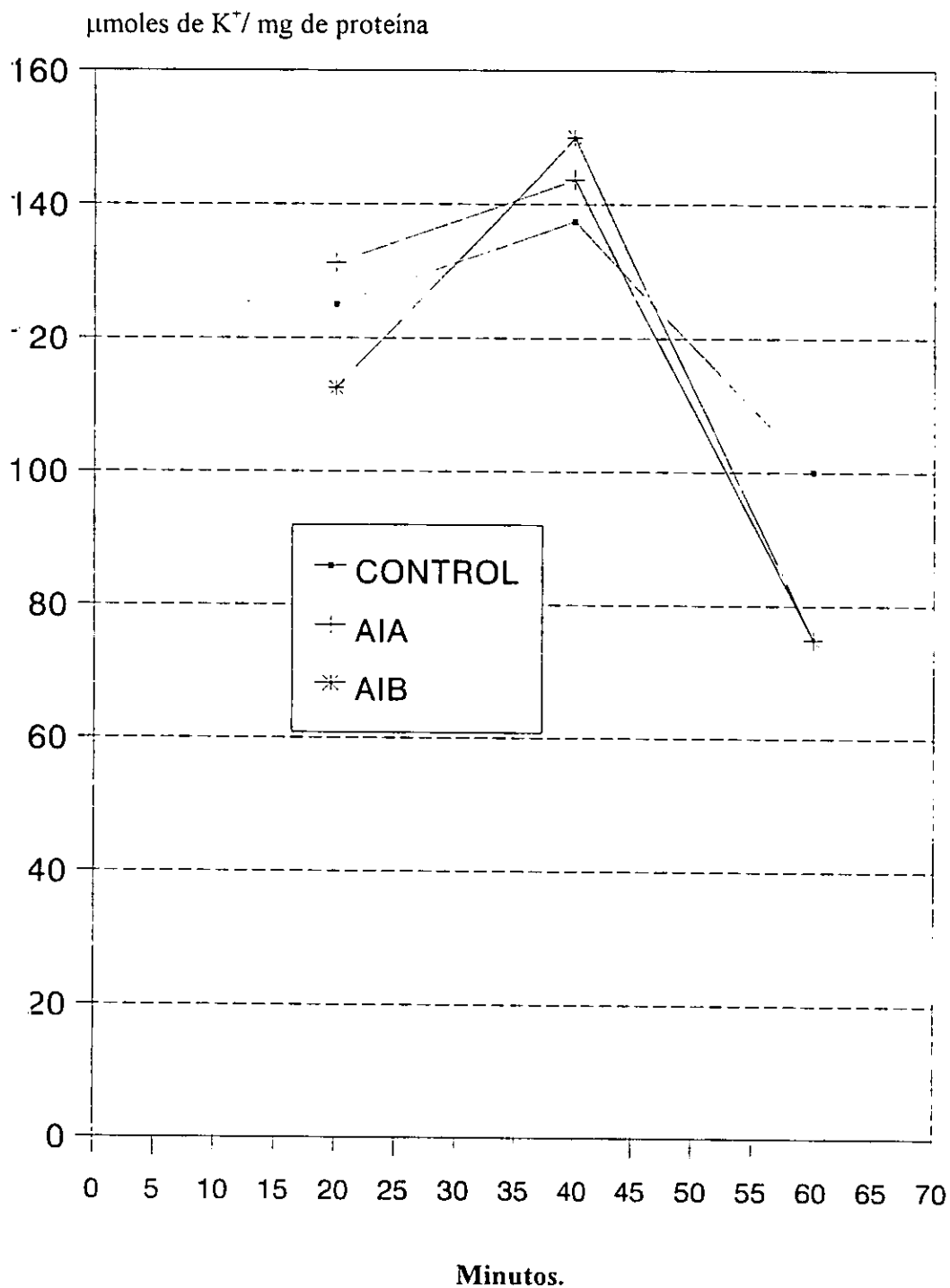


Figura 323. Se muestran los micromoles de iones potasio en mitocondrias que fueron incubadas en presencia de AIA o AIB, o en su ausencia (tratamiento control). La composición del medio se describe en material y métodos. Las concentraciones finales de AIA y AIB correspondieron a  $50 \mu\text{M}$ . Se interrumpió la incubación a los 20, 40 y 60 min, sedimentando las mitocondrias y digiriendo con ácido nítrico para medir por flamometría el contenido de  $\text{K}^+$ .



La captación de calcio por parte de las mitocondrias disminuyó, con la aplicación del AIA y el AIB, después de una hora, la variación fue muy notable, provocando una mayor disminución en ese tiempo el AIA, en contraste con el mayor efecto inhibitorio sobre la respiración por parte del AIB. De cualquier forma, se considera que el efecto sobre la captación del calcio se encuentra estrechamente vinculado con la disminución en el bombeo de protones, como consecuencia del abatimiento de la respiración determinando una menor tendencia a la incorporación de cationes, entre ellos el calcio. Se consideró importante el efecto observado en la figura R23, en la que se aprecia un efecto de las 2 auxinas, disminuyendo la captación de potasio por las mitocondrias, que se considera refleja el efecto inhibitorio provocado sobre la respiración. Los efectos así observados, sugieren que al alterarse la respiración mitocondrial por parte de las auxinas, se limita la captación de cationes por parte de las mitocondrias. La mayor actividad del AIA en la disminución de la acidificación del medio provocada por las mitocondrias, y en la disminución en la captación de  $Ca^{2+}$ , no fue consecuente con la mayor actividad que demostró el AIB como inhibidor de la respiración mitocondrial y como mejor promotor de la formación de raíces adventicias.

## Discusión

La capacidad del AIB para promover la formación de raíces adventicias fue superior en todos los tratamientos realizados. Esta pronunciada diferencia podría atribuirse en principio a la posible mayor resistencia que opusiera el AIB a ser degradado con respecto al AIA, como lo han sugerido Epstein y Ludwig-Muller (1993), y como podría interpretarse de la mayor afinidad de la auxina-oxidasa hacia el AIA ( $K_m = 41.76 \mu\text{M}$ ), con respecto a la que se encontró para el AIB ( $K_m = 74.95 \mu\text{M}$ ) en el presente trabajo. Sin embargo, el incremento de la concentración de AIA en las soluciones de tratamiento no condujo a una mayor promoción en la formación de raíces adventicias (resultados no mostrados), como se esperaría si la razón por la que esta auxina no promoviera tan eficazmente el citado proceso, fuera su inactivación por oxidación. Además, la utilización del FG, agente que en este trabajo demostró su capacidad para interferir con la oxidación de las auxinas actuando como antioxidante, no permitió elevar la respuesta rizogénica a los valores que fueron obtenidos al tratar con AIB. Lo anterior, sugiere que la alta capacidad del AIB no se debe únicamente a su mayor resistencia a ser degradado, sino como se discutirá más adelante, a su actividad inhibitoria sobre la respiración mitocondrial.

El AIB no se oxida *in vitro* por la peroxidasa de rábano tipo II en ausencia de peróxido de hidrógeno (ensayo 7, tabla 6 y figura R5A) y tampoco es oxidado, en estas condiciones, por el extracto con actividad de auxina oxidasa (ensayo 7, tabla 7), lo que lleva a sugerir que su oxidación sólo ocurra cuando en el tejido se produzca  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos

resultados refuerzan que el AIB es más resistente a ser degradado, aunque este aspecto no es el único que debe considerarse para explicar la mayor actividad del AIB.

Dada la toxicidad del  $H_2O_2$ , sería deseable que la acumulación de este compuesto ocurriera en algún compartimento que mantuviera al peróxido aislado de los sistemas que resultarían dañados por éste, y al mismo tiempo, que en este compartimento se encontraran peroxidases capaces de oxidar auxinas. Como se demuestra en la figura R9, la peroxidasa catiónica con mayor actividad de oxidasa de auxinas se localizó en la fracción sobrenadante del tejido digerido con celulasa y pectinasa, que indica su presencia en el apoplasto. La existencia de un sistema de peroxidases con localización extracelular en plantas, ha sido reportado por diferentes autores, entre los que se pueden citar a Ridge y Osborne (1971), Goldberg (1986), Zheng y Van Huystee (1992), Schopfer (1996) y Chanda y Singh (1997), la presencia de  $H_2O_2$  en el apoplasto, ha sido demostrada por Schopfer, (1994), y el mismo autor ha propuesto la existencia de sistemas que pueden segregarlo hacia la pared, y con ello controlar su concentración.

La localización de peroxidases con actividad de auxina oxidasa en el apoplasto favorecería la degradación del AIA con respecto al AIB, considerando que éste último, por su naturaleza menos polar, se incorporaría con mayor velocidad a las células y se tendría una menor concentración en el apoplasto; este efecto, sumado a la menor  $K_m$  que demostró la PCA, hacia el AIB ( $K_m = 74.95 \mu M$ ), comparada con el AIA ( $K_m = 41.74 \mu M$ ), soporta razonablemente que el AIB se oxide con mayor dificultad, tomando en cuenta que la  $K_m$

puede ser una medida aproximada a la afinidad de la enzima por su sustrato. Contar con  $H_2O_2$  en el apoplasto representa una dificultad más para degradar al AIB. Los valores de  $K_m$  encontrados para ambas auxinas, tienen sentido, a la luz de las condiciones que podrían encontrarse en la planta y que permitirían la actividad de auxina-oxidasas. De acuerdo con el reporte de Peters y colaboradores (1997), el AIA es metabolizado cuando se le aplica a segmentos de coleoptilos de maíz a una concentración de  $10 \mu M$ , que puede atribuirse a la presencia de enzimas como la PCA, que presentan una afinidad hacia el AIA compatible con las concentraciones que podrían tenerse *in vivo*, en el apoplasto.

Si se intentara atribuir la gran diferencia en la capacidad de promoción rizogénica entre el AIB y el AIA a la actividad de auxina oxidasa, se requeriría demostrar que no se encontrara peróxido de hidrógeno o algún otro cofactor, en las regiones que contuvieran AIB, para suponer una resistencia a su oxidación. Al no tener evidencia que esta condición se presente, resulta insatisfactorio que para esta capacidad se responsabilice exclusivamente a la actividad de auxina oxidasa, que tan sólo es uno de los sistemas que controlan el nivel endógeno de las auxinas (Brock, 1993). También podrían presentarse importantes diferencias en el grado de conjugación del AIB con respecto al AIA porque fuera mayor la estabilidad de los conjugados del AIB, porque el tejido pueda convertir más eficientemente el conjugado en AIB libre o porque sea más fácil incorporarlo y transportarlo, sin que se haya reunido aún suficiente evidencia para soportar cualquiera de estas hipótesis (Epstein y Ludwig Müller, 1993).

El limitado efecto promotor de la formación de raíces adventicias que presentó el FG parece residir en su capacidad para interferir con la oxidación del AIA, de acuerdo a lo observado en los ensayos enzimáticos mostrados en las tablas 6 y 7, sólo que en lugar del papel que se ha sugerido para los compuestos fenólicos como inhibidores de la AIAoxidasa (Lee, 1980; Lee et al, 1978; Lee et al, 1982; Balasimha y Subramonian, 1983) en el presente trabajo se observó una actividad antioxidante en el FG. La estimulación de la formación de raíces adventicias en los hipocotilos de frijol mungo por parte del FG en el intervalo de concentraciones probadas coincide con el efecto promotor de la iniciación de raíces en estacas de manzano reportado por Jones (1976) y por James y Thurbon (1981b), y en general, se suma a los efectos que diferentes compuestos fenólicos producen sobre el crecimiento de las plantas (James y Thurbon, 1981a; Bose et al, 1972; Hegedus y Phan, 1983; Hess, 1962; Hess, 1969; Kefeli, 1978; Krull, 1968). El reporte de James y Thurbon (1981b) indica que el FG actúa como sinergista de auxinas en el rango de concentraciones de  $1.29 \times 10^{-4}$  M a  $1.29 \times 10^{-2}$  M. La concentración de FG que demostró actividad antioxidante fue de  $3 \times 10^{-4}$  M, teniendo sentido de esta forma, la interpretación de su modo de acción. Probablemente el efecto del FG podría provocar una desviación de la degradación de auxinas como el AIA, hacia la formación de derivados no oxindólicos, como lo han sugerido Grambow y Lagenbeck-Schwich (1983). Este punto de vista explica los resultados reportados en las figuras R3d y R4d y los de la figura R5c y R5d. Es posible que la propia formación de productos de oxidación de compuestos como el floroglucinol (que se demuestra en la figura R4c), interfiera con la vía oxindólica de la oxidación de auxinas.

El AIB demostró una mayor actividad inhibitoria sobre la respiración de mitocondrias aisladas, con respecto al tratamiento con AIA. El AIB inhibió en alrededor del 50% la respiración a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , que resulta significativo, si se atiende a ciertos valores que representan un índice de la concentración intracelular de auxinas, como la  $K_d$  de la ABP1 (Auxin Binding Protein 1), que tiene un valor de 4.75  $\mu\text{M}$  (Tian et al. 1995), y que a una concentración de casi 4 veces la  $K_d$ , o del doble de lo que es aceptado como concentración fisiológica de las auxinas (10  $\mu\text{M}$ ), obtener un 50% de inhibición resulta muy significativo. La concentración de AIA que provocó un grado de inhibición próximo a 50% en la respiración mitocondrial, fue de 40  $\mu\text{M}$ , lo que sugiere que haya un efecto fisiológico menos pronunciado, como pudo demostrarse en los ensayos que establecieron que la respuesta rizogénica es menos promovida por el AIA, con respecto al AIB.

El mayor carácter no polar del AIB y su efecto más pronunciado sobre la respiración, hacen suponer que la interacción se establezca con los componentes de la membrana interna de la mitocondria, en donde residen los componentes de la cadena respiratoria.

Cuando se corta una porción de una planta se afectan múltiples variables, entre las cuales puede destacarse la interrupción del aporte que significaba el segmento de tejido que se excluyó, y consecuentemente se altera el gradiente de hormonas y de otras sustancias en el segmento obtenido. En la presente tesis se descubre un efecto inhibitorio por parte de las auxinas sobre las mitocondrias aisladas de hipocotilos de frijol mungo, que puede tener

significación fisiológica y permitir explicar efectos que se han reportado, sin que hasta antes del presente trabajo, se haya construido un marco teórico que los soporte:

- 1) La participación de desacoplantes de la respiración que promueven la rizogénesis como el 2,4-dinitrofenol (Riov y Yang, 1989)
- 2) La inhibición de enzimas estrechamente vinculadas con la fosforilación oxidativa y la respiración por parte de reguladores del crecimiento como la inhibición de la NADH deshidrogenasa de la membrana mitocondrial externa de plantas por el 2,4-D y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (Mannella y Bonner, 1978) y la inhibición que provoca el 2,4-D sobre la actividad de malato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa en mitocondrias de papa (Roussaux et al, 1986)
- 3) La estimulación que produce el 2,4-D en la afinidad de la ATPasa por su sustrato a bajas concentraciones de ATP (Scherer, 1984) que permitiría la expulsión de protones a pesar de la disminución de los niveles de ATP, y que al mismo tiempo representaría una forma de consumo de este compuesto de alta energía, que podría acentuar su disminución.
- 4) Se ha encontrado una disminución en la respiración en el tejido de reserva de *Beta vulgaris* en la presencia de 1 mM de AIA y otras auxinas (Lambers et al, 1996).

Los efectos antes mencionados tienen sentido a la luz de la interpretación que puede hacerse de los resultados de este trabajo de tesis, misma que consiste en que las auxinas se incorporan al citosol, interactúan con las mitocondrias e inhiben la respiración. Por otra parte, dado que las auxinas estimulan la actividad de  $H^+$ -ATPasa en membrana plasmática (Napier y Venis, 1995), cabe suponer que se reduce la concentración de ATP (se reduce su

síntesis y se consume en mayor grado, puesto que lo utiliza como sustrato la  $H^+$ -ATPasa, cuya actividad se incrementa al tratamiento con auxinas), por lo que se espera que haya un aumento de iones  $Ca^{2+}$  en el citosol, que ha podido ser medido por diferentes grupos (Tester, 1990; Terry et al, 1992; Barbier-Brigoo et al, 1989); sin embargo, también pudiera elevarse el  $Ca^{2+}$  en el citosol, en respuesta al  $IP_3$  (Schumaker y Sze, 1987), o bien al modificarse el voltaje, a través de la apertura de canales sensibles a esta variable (Johannes et al, 1992). Particularmente, es interesante la posibilidad de que las modificaciones en factores como la concentración de  $Ca^{2+}$ , la de ATP o cambios en el pH, puedan regular la unión del  $IP_3$  y la apertura del canal de  $Ca^{2+}$ , como lo reportan en el caso de células animales Taylor y Marshall (1992) y Berridge (1993). El ion  $Ca^{2+}$  ha sido considerado un mensajero intracelular (Hepler y Wayne, 1985), en condiciones normales se expulsa intensamente, mediante una ATPasa de  $Ca^{2+}$ , manteniendo una concentración submicromolar de este ion en el citosol. Así, diferentes agentes que desacoplan (como el caso indicado en 1), o disminuyen la respiración (como lo señalado en 4), consecuentemente estimularían el crecimiento y también, los reguladores del crecimiento podrían disminuir la síntesis de ATP (como lo mencionado en 2) o estimular su consumo (que se refiere en 3).

Sobre esta línea de ideas, no resulta incongruente que la reducción de la presión parcial de  $O_2$  influya en la inducción de la embriogénesis somática, como lo han reportado Kvaalen y Ernsten (1993). Los autores suponen que el  $O_2$  causa un cambio en los niveles endógenos de benciladenina (BA) o del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2, 4-D), ya que demostraron que se inhibió la incorporación de 2, 4-D a bajos niveles de  $O_2$  y que la



concentración de BA se incrementó hasta el día tres, decreciendo gradualmente después de ese tiempo. Sin embargo, bajo el marco de la hipótesis del presente trabajo, el bajo nivel de O<sub>2</sub> pudo conducir a cambios dentro de la célula, similares a los que pueden provocar los reguladores del crecimiento al inhibir la respiración, y que por tal motivo las respuestas rizogénicas pudieron ser promovidas por estas dos situaciones. En esta tesis, no se midieron los niveles de reguladores del crecimiento pero sí se demostró una disminución en la actividad respiratoria en mitocondrias aisladas por efecto de AIA y AIB. Este efecto puede significar que se disminuyan los niveles de ATP y en consecuencia, se afecten los sistemas de transporte, entre los cuáles se encuentra el de las hormonas (sin olvidar que al trabajarse mitocondrias aisladas no se tiene la complejidad del sistema que implica la plántula, y que se esté simplificando una realidad más compleja) o el de iones como el Ca<sup>2+</sup>, que es un mediador de muchos procesos de desarrollo, hormonales y ambientales en las células vegetales (Subbaiah et al, 1994). Resulta particularmente importante en cuanto a la posible participación del Ca<sup>2+</sup> en los procesos de desarrollo vinculados con condiciones que llevarían a una reducción en los niveles de ATP, lo reportado por estos mismos autores, quienes encuentran que el calcio está involucrado en las respuestas de las células vegetales a la anoxia, ya que la aplicación de rojo rutenio (inhibidor del flujo de calcio en organelos) reprimen la activación por anoxia de genes que codifican enzimas como la alcohol deshidrogenasa. Se sugiere que las reservas intracelulares de Ca<sup>2+</sup> y el calcio movilizado de esta fuente es un transductor fisiológico de los signos de stress por anoxia (Subbaiah et al, 1994), y si la vía por la que estos efectos se producen es la reducción en los niveles de ATP,

no causa sorpresa que las auxinas inhiban la respiración y promuevan un evento morfogénico.

Los resultados obtenidos en los tratamientos de plántulas con inhibidores de la respiración, de la síntesis de ATP o de la translocación de ADP refuerzan el modelo que supone una afectación de los niveles de ATP como antecedente de la respuesta de formación de raíces adventicias. Sin embargo, no parece congruente que una disminución en la incorporación de la propia auxina como resultado de la posible afectación de sistemas de transporte que la incorporen a las células en las que ejercerá su efecto, favorezca la respuesta rizogénica, pero sí tiene sentido que al afectarse sistemas que expulsan auxinas, el nivel de éstas se incremente intracelularmente y así se favorezca su efecto fisiológico. En las células vegetales es determinante el gradiente de hormonas para asegurar el crecimiento coordinado de los órganos y la polaridad de la morfogénesis en el desarrollo vegetal (Sitbon and Perrot-Rechenman, 1997). El transporte polar de auxinas contribuye a este gradiente. La polaridad en el transporte está determinada por factores como: la existencia de gradientes de  $H^+$  que influyen en la permeabilidad de las auxinas; la presencia de acarreadores que pueden ser impulsados por gradientes de carga (cotransporte de IAA<sup>-</sup> con  $2 H^+$ ) y la disposición asimétrica de acarreadores de tipo uniport auxina-anión en las regiones apical y basal de las células (Allan y Rubery, 1991). En este último sistema puede suponerse que al afectarse la fuente de energía para la expulsión de auxinas por parte de estos acarreadores, se eleven los niveles intracelulares y se perturbe su gradiente de concentración.

Hasta ahora se ha señalado que aumenta la turgencia en las primeras etapas del desarrollo de raíces adventicias (Attfield y Evans, 1991) sin que se haya señalado por qué. En el presente estudio se encontró que los cationes pueden incrementar su concentración en el citosol como consecuencia de un cambio en su captación, bajo la influencia de auxinas, por parte de la mitocondria, que es consecuente con el efecto de incremento en la turgencia de las células. También se ha reportado que las auxinas estimulan la acidificación del apoplasto mediante un incremento en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa. Este efecto promovería una hiperpolarización, que facilitaría también la entrada de cationes al citosol, provocando un aumento de turgencia.

Se ha demostrado recientemente que la acidificación que promueven las auxinas en coleoptilos de maíz, es transitoria, en vista de que éstas son metabolizadas, sin que se hayan identificado los productos de su degradación (Peters et al, 1997). Los resultados del presente trabajo demostraron la presencia de enzimas con actividad de auxina oxidasa, una de las cuáles fue localizada en el apoplasto, que podría ser responsable del metabolismo de auxinas, que demostró no tener bandas contaminantes visibles al correr un gel de poliacrilamida, que tiene un pH óptimo para oxidar AIB de 3.9 y para oxidar AIA de 4.5, lo que implica que la propia acidificación estimula la degradación y por tanto sus efectos deben ser transitorios, como lo reportan Peters et al (1997). La actividad de auxina oxidasa localizada en el apoplasto y con pH óptimo ácido, representaría un excelente mecanismo de control de los niveles de hormona, por su localización extracelular y porque las auxinas estimulan la acidificación en el apoplasto, con estas características, se lograría su

inactivación antes de ser incorporadas a la célula. También resulta muy significativa la mayor actividad de auxina oxidasa encontrada en el tejido radical, ya que si esta enzima está implicada en el control de los niveles de auxinas y éstas determinan la respuesta rizogénica, conforme se incrementa la proporción de tejido radical (mientras más raíces se forman), se tiene una mayor degradación de auxinas, evitando la sobreproducción de este tejido. Si la hipótesis del presente trabajo es correcta, esta última condición sería muy importante para no dañar a la célula al prolongarse la disminución de las reservas de ATP. Puede agregarse a lo que ya se ha indicado, que la naturaleza catiónica de la PCA, sugeriría una interacción notable con los pectinatos, y otros derivados poliméricos con grupos ácidos en la pared celular. Sería muy interesante establecer si la acidificación del apoplasto promovida por las auxinas es capaz de provocar la disociación de la PCA de la pared celular, y si la actividad de auxina oxidasa varía en función del estado (asociado o disociado) en que se encuentre, ya que es muy sugerente la posibilidad de que mientras el medio no se acidifique, la enzima sea inactiva (mientras permanezca asociada con componentes de la pared mediante interacciones iónicas), y que el aumento en la concentración de  $H^+$ , provocara su disociación, promoviendo su activación. Se han reportado peroxididasas con actividad de auxina oxidasa, que están asociadas iónicamente a la pared celular (Ridge y Osborne, 1971; Chanda y Singh, 1997), aunque no se ha investigado si la asociación o disociación significan cambios en la actividad.

Bajo el supuesto de que una manera de reponer el ATP que hubiera disminuido por efectos de las auxinas sería el de administrar luz para que la fotosíntesis se activara con la

consecuente producción de ATP, se realizaron tratamientos con luz. Los resultados que se obtuvieron no están en favor de la hipótesis de este trabajo, ya que no disminuyó de forma significativa el efecto del AIB sobre la formación de raíces adventicias cuando las plántulas fueron iluminadas. Sin embargo, el empleo de la luz tiene efectos en muchos sentidos, por lo que sería una simplificación extrema el suponer que sólo incidiría sobre los niveles de ATP. De cualquier manera, cabe suponer que en presencia de las auxinas, se vea afectada la actividad de transporte electrónico en los cloroplastos, de forma similar a la que se observó en mitocondrias aisladas, y de esta forma el AIB no disminuiría sus efectos sobre la formación de raíces adventicias.

Por otra parte, la actividad de las auxinas o de otras sustancias como la fusicoccina, que estimulan el consumo de ATP mediante la actividad de la  $H^+$ -ATPasa (Prins, 1994), tienen efectos promotores del crecimiento. El propio crecimiento de las células implica un consumo de ATP. Estos aspectos invitan a realizar mediciones, que resuelvan si se encuentran explicaciones satisfactorias acerca del posible papel que juega una disminución en las concentraciones de ATP y las respuestas morfogénicas, particularmente, la formación de raíces adventicias.

Las auxinas interactúan con la célula blanco en diferentes niveles. Bajo su influencia se activan y reprimen genes, se incrementa la expulsión de  $H^+$ , se afecta la respiración mitocondrial y en consecuencia la síntesis de ATP, se estimula el consumo de ATP para el bombeo de  $H^+$  y todo esto incide en que se facilite el aumento de la concentración de

aquellos iones que se mantienen en bajos niveles gracias al transporte activo, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , adicionalmente, el aumento de  $\text{H}^+$  en el apoplasto debe aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre por que al interactuar con los pectinatos de la pared celular puede desplazarlo, y el aumento de este ion en apoplasto facilita su entrada hacia el citosol permitiendo que puedan activarse un conjunto de enzimas que favorecerán la diferenciación de raíces adventicias.

No se demuestra en el presente trabajo que se incremente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. Se intentó determinar, cuidando de digerir la pared celular, que es un reservorio de este ión, para controlar de forma eficiente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Sin embargo, en los intentos realizados, se observó que cuando se obtienen protoplastos en medios sin  $\text{Ca}^{2+}$ , se tornan frágiles y se lisan. El empleo de fluoróforos podría ayudar a establecer si se acumula este ión. La obtención de vesículas membranales que contengan ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATPasa de protones, preparadas en medios conteniendo concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  variables, parecen representar una excelente opción para esclarecer la forma en la que se relacionan los procesos que modifican los niveles de ATP y la formación de raíces adventicias.

## **Conclusiones**

Los resultados del presente trabajo comprueban la suposición hecha en la hipótesis, que las auxinas interfieren los procesos de respiración con la posible disminución de síntesis de ATP, aunque no se demuestra directamente que se incremente la concentración de iones en el citosol como resultado de esta interferencia. Tampoco se demuestra que cambien los niveles de ATP. Tal como se supuso, el AIB tuvo un mayor efecto inhibitorio que el AIA,

aquellos iones que se mantienen en bajos niveles gracias al transporte activo, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , adicionalmente, el aumento de  $\text{H}^+$  en el apoplasto debe aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre por que al interactuar con los pectinatos de la pared celular puede desplazarlo, y el aumento de este ion en apoplasto facilita su entrada hacia el citosol permitiendo que puedan activarse un conjunto de enzimas que favorecerán la diferenciación de raíces adventicias.

No se demuestra en el presente trabajo que se incremente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. Se intentó determinar, cuidando de digerir la pared celular, que es un reservorio de este ión, para controlar de forma eficiente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Sin embargo, en los intentos realizados, se observó que cuando se obtienen protoplastos en medios sin  $\text{Ca}^{2+}$ , se tornan frágiles y se lisan. El empleo de fluoróforos podría ayudar a establecer si se acumula este ión. La obtención de vesículas membranales que contengan ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATPasa de protones, preparadas en medios conteniendo concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  variables, parecen representar una excelente opción para esclarecer la forma en la que se relacionan los procesos que modifican los niveles de ATP y la formación de raíces adventicias.

## **Conclusiones**

Los resultados del presente trabajo comprueban la suposición hecha en la hipótesis, que las auxinas interfieren los procesos de respiración con la posible disminución de síntesis de ATP, aunque no se demuestra directamente que se incremente la concentración de iones en el citosol como resultado de esta interferencia. Tampoco se demuestra que cambien los niveles de ATP. Tal como se supuso, el AIB tuvo un mayor efecto inhibitorio que el AIA,

probablemente por su naturaleza menos polar. Se demostró también, con excepción del tratamiento con  $\text{CN}^-$  que resultó muy tóxico, que la oligomicina, el carboxiatractilósido y la anímicina A, todos ellos agentes que interfieren la síntesis de ATP, estimulan de forma muy importante la formación de raíces adventicias en hipocotilos de frijol mungo. La oligomicina, estimuló en mayor proporción que el AIB este proceso. De acuerdo a la hipótesis, se demostró también que la auxina que más estimuló la formación de raíces adventicias, provocó la mayor interferencia en la respiración. Se demostró también, la existencia de un sistema de peroxidasas con actividad de auxina oxidasa, cuyo principal componente fue localizado en la pared celular, coincidiendo con la localización ideal esperada, dada la toxicidad de los productos que esta actividad podría implicar, entre ellos el peróxido. (Grambow y Lagenbeck-Schwich, 1983). Se demostró que esta peroxidasa tiene un carácter catiónico, que su actividad es máxima a pH ácido y que es indispensable la presencia de peróxido para que oxide al AIB, en contraste con su actividad en ausencia de peróxido para oxidar al AIA. Estas características suenan idóneas para explicar las relaciones entre la actividad de acidificación del apoplasto que promueven las auxinas, la interacción iónica de la PCA con la pared celular, el aumento de su actividad cuando hay auxinas en el medio, aumentando la eficiencia en la inactivación de las mismas, y en el control que puede tenerse sobre ella regulando la disponibilidad de peróxido, que para la oxidación de AIB es indispensable y para la del AIA es un factor estimulante. Finalmente, el registro de una mayor  $K_m$  aparente para la oxidación del AIB con respecto al AIA ayuda a tener una explicación razonable de la mayor actividad biológica del AIB, en tanto que la velocidad de degradación de esta auxina no es estimulada en la misma medida por aumentos en la concentración, con respecto a lo que sucede con el AIA. Si la  $K_m$  aparente del AIB es mayor, su inactivación sería más difícil y se mantendría un mayor tiempo activo, cuando menos como resultado de la participación de este componente.



## Referencias

1. Alexandre, J.; Lassalles, J.P. and Kado, R.T. 1990. Opening of  $\text{Ca}^{+2}$  channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1, 4, 5-triphosphate. *Nature* 567-570.
2. Allan, A.C. and Rubery, P.H. 1991. Calcium deficiency and auxin transport in *Cucurbita pepo* L. seedlings. *Planta*. 183:604-612.
3. Allan, E. and Trewavas, A.J. 1987. The Role of calcium in metabolic control. In *The biochemistry of plants, Vol 12*. Eds. P.K. Stumpf and E.E. Conn. Academic Press, London and New York. pp. 117-149.
4. Altamura, M.M.; Torrigiani, P.; Capitani, F.; Scaramagli, S. and Bagni, N. 1991. *De novo* root formation in tobacco thin layers is affected by inhibition of polyamine biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 42(245):1575-1582.
5. Altman, A. 1989. Polyamines and plant hormones -In *The Physiology of Polyamines* (U. Bachrach and Y.M. Heimer, eds.) Vol II. pp121-125. CRC Press, Boca Ratón, FL. ISBN-0-8493-6809-X.
6. Alvarez, R.; Nissen, S.J. and Sutter, E.G. 1989. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid *Plant Physiol.* 89:439-443.
7. Amako, K., Chen, G.-X. and Asada, K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.* 35 (3):497-504.
8. Arif, I. and Newman, A. 1993. Proton efflux from oat coleoptile cells and exchange with wall calcium after IAA or fusicoccin treatment. *Planta*. 189:377-383.
9. Atfield, E.M. and Evans, P.K. 1991. Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthine. *J. Exp. Bot.* 42(234):51-57.
10. Atfield, E.M. and Evans, P.K. 1991. Stages in the initiation of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthine. *J. Exp. Bot.* 42(234):59-63.
11. Baier, M.; Goldberg, R.; Catesson, A.M.; Francesch, C. and Rolando, C. 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochem.* 32(4):789-793.
12. Bachelard, E.P. and Stowe, B.B. 1963. Rooting of cuttings of *Acer rubrum* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 751-767.
13. Balasimha, D. and Subramonian, N. 1983. Role of phenolics in auxin induced rhizogenesis and isoperoxidases in cacao (*Theobroma cacao* L.) stem cuttings. *Indian J. Exp. Biol.* 21:65-68.
14. Balji, B.G.; Maher, B.R.; Slovin, J.P. and Cohen, J.D. 1991. Stable isotope labeling, *in vivo*, of D- and L- Tryptophan pools in *Lemna gibba* and the low incorporation of label into indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 95:1203-1208.
15. Bansal, M. and Nanda, K. 1981. IAA oxidase activity in relation to adventitious root formation on stem cuttings of some forest tree species. *Experientia.* 37:1273-1274.
16. Barbier-Brigoo, H.; Ephretikhine, G.; Klambt, D.; Ghislain, M. and Guern, J. 1989. Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:891-895.

17. Basu, N.N.; Bose, T.K.; Roy, B.N. and Mukhopadhyaya, A. 1969. Auxin Synergists in rooting of cuttings. *Physiol. Plant.* 22:649.
18. Basu, P. and Tuli, V. 1972. Auxin activity of 3-Metileneoxindole in wheat. *Plant Physiol.* 50:499-502.
19. Batten, D. J. and Goodwin, P.B. (1978). Phytohormones and the induction of adventitious roots. In: *Phytohormones and related compounds. A comprehensive treatise, Vol. 2* (Ed. by D. S. Letham, P.B. Goodwin and T.J.V. Higgins), pp 137-173. Elsevier/North Holland.
20. Ben Hayyim Ben-Hayyim, -Gozal. 1991. The Role of plasma membrane and tonoplast in salt-tolerance : characterization of the ATPases and ion transport properties. Bet Dagan, Israel CAT92987307..United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund.
21. Bernasconi, P.; Patel, B.C.; Reagan, J.D. and Subramanian, M.V. 1996. The N-1-Naphthylphthalamic acid-binding protein is an integral membrane protein. *Plant Physiol.* 111:427-432.
22. Berridge, M.J. 1993. Inositol Triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361:315-325.
23. Bialek, K. Meudt, W.J. and Cohen, J.D. 1983. Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections. IAA content and growth response. *Plant Physiol.* 73:130-134.
24. Bialek, K. and Cohen, J.D. 1992. Amide-linked indoleacetic acid conjugates may control levels of indoleacetic acid in germinating seedlings of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 100:2002-2007.
25. Blakesley, D. 1994. Auxin metabolism and adventitious root formation (T. D. Davis and B. E. Haissig eds.) pp. 143-154. Plenum Press N.Y. ISBN 0-306-44627-8.
26. Blakesley, D. Weston, G.D. and Hall, J.F. 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. Part I: Evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Regulation.* 10:341-353.
27. Blazich, F.A. and Heuser, C.W. 1979. A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:63-67.
28. Bolwell, G.P. 1988. synthesis of cell wall components: aspects of control. *Phytochemistry.* 27: 1235-1253.
29. Bonner, W. 1967. A general method for the preparation of plant mitochondria. *Methods in Enzymology.* X:126-132.
30. Bose, T.K.; Roy, B.N. and Basau, R.N. 1972. Synergism between auxins and phenolic compounds in the rooting of cuttings. *Indian Agr.* 16:171-176.
31. Bourquin, M. and Pilet, P.E. 1990. Effect of zeatin on the growth and indolyl-3 acetic acid and abscisic acid levels in maize roots. *Physiol. Plant.* 80:342-349.
32. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
33. Brock, T.G. 1993. Hormone trafficking. A case study of growth regulator dynamics. *Physiol. Plant.* 89: 237-241.
34. Brosnan, J.M. and Sanders, D. 1990. Inositol triphosphate-mediated calcium release in beet microsomes is inhibited by heparin. *FEBS Letters* 260:70-72.

35. Brownleader, M.; Golden, K.D. and Dey, P.M. 1993. An inhibitor of extensin peroxidase in cultured tomato cells. *Phytochem.* 33(4):755-758.
36. Burkhart, L.F. and Meyer, M.M. 1991. The gibberelin synthesis inhibitors, ancymidol and flurprimidol, promote in vitro rooting of white pine microshoots. *Plant Cell Reports* 10(9):475-476.
37. Campanella, J.J., Ludwig-Mueller J. and Town, C.D. 1996. Isolation and characterization of mutants of *Arabidopsis thaliana* with increased resistance to growth inhibition by indoleacetic acid-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 112:735-745.
38. Chanda S V. Singh Y D. 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiology & Biochemistry (Paris)* 35(3): 245-250.
39. Chaveau, M.; Dizengremel, P. Roussaux, J. 1983. Interaction of benzylamino-purine with electron transport in plant mitochondria during malate oxidation. *Plant Physiol.* 73:943-948.
40. Chen, C.M.; Ertl, J.R.; Leisner, S.M. and Chang, C.C. 1985. Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiol.* 78:510-513.
41. Christianson, M.L. and Warnick, D.A. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev. Biol.* 95:288-293.
42. Clarkson, S.P.; Large, P.J. and Bramforth, C.W. 1992. A two-substrate kinetic study of peroxidase cationic isoenzymes in barley malt. *Phytochem.* 31(3):743-749.
43. Cleland, R. 1991. The outer epidermis of *Avena* and maize coleoptiles is not a unique target for auxin in elongation growth. *Planta* 186:75-80.
44. Cleland, R.E. 1994. Characteristics and implications of prolonged fusaric acid-induced growth of *Avena* coleoptile sections. *Physiol. plant.* 90:655-660.
45. Cleland, R.E.; Buckley, G.; Nowbar, S.; Lew, N.M.; Stinemetz, C.; Evans, M.L. and Rayle, D.L. 1991. The pH profile for acid-induced elongation of coleoptile and epicotyl sections is consistent with the acid growth theory. *Planta* 186:70-74.
46. Cline, M.G. 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* 90:230-237.
47. Cooper, W.C. 1935. Hormones in relation to root formation on stem cuttings. *Plant Physiol.* 10:789-794.
48. Darbyshire, B. 1973. The glycoprotein nature of indoleacetic acid oxidase/peroxidase fractions and their development in pea roots. *Physiol. Plant.* 29:293-297.
49. Davies, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404-427.
50. De Guzmán, C.C. and de la Fuente, R.K. 1984. Polar calcium flux in sunflower hypocotyl segments. I. The effect of auxin. *Plant Physiol.* 76:347-352.
51. De Klerk, G.J.; Ter Brugge, J.; Smulders, R. and Benschop, M. 1990. Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. *Acta Hort.* 280:29-36
52. Delbarre, A.; Muller, P.; Imhoff, V. and Guern, J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198:532-541.
53. De la Fuente, R.K. 1984. Role of calcium in the polar secretion of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 76:342-346.
54. Demorest, D.; Stahmann, M. 1972. The binding of peroxidase oxidation products of Indole-3-acetic acid to histone. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 47:227-233.

55. Dencheva, A. and Klisurska, D. 1982. Interaction between peroxidase and IAA-oxidase in the course of growth and differentiation of plant cells. *Physiol. Vwg.* 20:385-394.
56. Díaz-Sala, C.; Hutchison, K.W., Goldfarb, B. and Greenwood, M.S. 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiol. Plant.* 97:481-490.
57. Dizengremel, P.; Chauveau, M. and Roussaux, J. 1982. Inhibition of adenine derivatives of the cyanide insensitive electron transport pathway of plant mitochondria *Plant Physiol.* 70:585-589.
58. Eliasson, L. 1972. Translocation of shoot applied indolylacetic acid into the roots of *Populus tremula*. *Physiol. Plant.* 27:412-416.
59. Eliasson, L. and Arebald, K. 1984. Auxin effects on rooting in pea cuttings. *Plant Physiol.* 61:293-297.
60. Endo, T. 1968. Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes. *Plant Cell Physiol.* 9:333-341.
61. Epstein, E. and Ludwig-Müller, J. 1993. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiol. Plant.* 88:382-389.
62. Eriksen, E.N. and Mohammed, S. 1974. Root formation in pea cuttings. II. The influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. *Physiol. Plant.* 30:158-162.
63. Evans, D.E. 1988. Regulation of free calcium by plant cell membranes. *Cell Biol. Int. Rep.* 12:383-396.
64. Evans, M. 1984. Functions of hormones at the cellular level of organization. Hormonal Regulation of Development II. The Functions of hormones from the level of the cell to the whole plant. Ed. T.K. Scott. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol.10. Springer-Verlag. pp.23-79.
65. Fabijan, D.; Yeung, E.; Mukherjee, Y. and Reid, D.M. 1981. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) Seedlings.
66. Feirer, R.B.; Mignon, G. and Litvay, J.D. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in wild carrot. *Science.* 223:1433-1435.
67. Ferrer, M. A., Pedreño, M.A.; Muñoz, R. and Ros Barceló, A. 1992. Constitutive isoflavones as modulators of indole-3-acetic acid oxidase activity of acidic cell wall isoperoxidases from lupin hypocotyls. *Phytochem.* 31(11):3681-3684.
68. Fink, S. 1972. Adventitious root primordia: The cause of abnormally broad xylem rays in hard- and softwoods. *Int. Assoc. Wood Anatomists.* 3:31-38.
69. de Forchetti, S.M. and Tigier, H.A. 1983. Effect of dicarboxylic acids on the peroxidase-IAA-oxidase isozymes of soybean callus. *Physiol. Plant.* 59:355-358.
70. Fox, L.R. and Purves, W.K. 1968. The mechanism of peroxidase catalysis of 3-indoleacetic acid oxidation. In Biochemistry and Physiology of Plant Growth substances. Wightman, F. and Setterfield, G. (Eds.) The Runge Press, Ottawa, Canada. pp. 301-309.
71. Fox, L.R.; Purves, W.K. and Nakada, H.I. 1965. The role of horseradish peroxidase in indole-3-acetic acid oxidation. *Biochem.* 4:2754-2763.
72. Friedman, R.; Altman, A. and Bachrach, U. 1982. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. I. Effects of exogenous compounds and changes in endogenous polyamines content. *Plant Physiol.* 70:844-848

73. Friedman, R.; Altman, A. and Zamsky, E. 1979. Adventitious root formation in bean hypocotyl cuttings in relation to IAA translocation and hypocotyl anatomy. *J. Exp. Bot.* 30(117):769-777.
74. Galston, A.W. and Davies, P.J. 1969. Hormonal regulation in higher plants. *Science* 163:1288-1297.
75. García-Florenciano, E.; Calderón, A.A.; Muñoz, R. and Ros Barceló, A. 1991. Epigenetic control of extracellular auxin catabolism in grapevine cells cultured in suspension. *Vitis*. 30:57-69.
76. García-Florenciano, E.; Calderón, A.A.; Muñoz, R. and Ros Barceló, A. 1992. The decarboxylative pathway of indole-3-acetic acid catabolism is not functional in grapevine protoplasts. *J. Exp. Bot.* 43(250):715-721.
77. García-Florenciano, E.; Pedreño, M.A.; Muñoz, R. and Ros Barceló, A. 1990. The specific expression of isoperoxidases in grapevine cells cultured in suspension in relation to vacuolar development. *Vitis*. 29: 189-198.
78. Gaspar, Th.; Hagege, D.; Kevers, C.; Penel, C.; Crèvecoeur, M.; Engelman, I.; Greppin, H. and Foidart, J.M. 1991. When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. *Physiol. Plant.* 83:693-701.
79. Gaspar Th. and Hofinger, M. 1988. Auxin Metabolism during adventitious rooting. In Davis, T.D.; Haissig, B.E.H. and Sankhla, N. Ed. Adventitious root formation in cuttings. Dioscorides Press. Portland Oregon. ISBN 0-931146-10-0. pp. 117-131.
80. Gaspar, Th.; Penel, C.; Thorpe, T. and Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève-Centre de Botanique. Genève. 1982. 324 pp.
81. Gaspar, T. Penel, Cl. Roduit, Cl. Moncousin, C. and Greppin, H. 1985. The role of auxin level and sensitivity in floral induction. *Biol. Plant.* 27:325-329.
82. Geneve, R.L. and Kester, S.T. 1991. Polyamines and adventitious root formation in the juvenile and mature phase of English ivy. *J. Exp. Bot.* 42(234):71-75.
83. Gesto, M.D.V.; Vázquez, A. and Vieitez, E. 1977. Rooting substances in water extracts of *Castanea sativa* and *Salix viminalis*. *Physiol. Plant.* 40:265-268.
84. Goldberg, R.; Imberty, A. and Chu-Ba, J. 1986. Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry*. 25:1271-1274.
85. Goldsmith, M.H.M. 1977. The polar transport of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28:439-478.
86. Gordon, S.A. and Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 26:192-195.
87. Gorst, J.R.; Slaytor, M. and Fossard, R.A. 1983. The effect of indole-3-butyric acid and riboflavin on the morphogenesis of adventitious root of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. grown *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 34:1503-1515.
88. Gorter, C.J. 1969. Auxin synergists in the rooting of cuttings. *Physiol. Plant.* 22:497-502.
89. Grambow, H. and Lagenbeck-Schwich, B. 1983. The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide and phenolic compounds in the degradation of Indole-3-acetic acid *in vitro*. *Planta*. 157:131-137.

90. Graziana, A.; Fosset, M.; Ranjeva, R.; Hetherington, A.M. and Lazdunski, M. 1988. Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca<sup>2+</sup> entry into protoplasts. *Biochemistry* 27:764-768.
91. Guern, J. 1987. Regulation from within: the hormone dilemma. *Ann. Bot.* 60:75-102.
92. Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Li, Y., Ulmasov, T., Liu, Z., Strabala, T. and Gee, P. 1993. Auxin-regulated transcription. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 489-502.
93. Gurumurti, K., Chibbar, R.N. and Nanda, K.K. 1974. Evidence for the mediation of indole-3-acetic acid effects through its oxidation products. *Experientia* 30 (9): 997-998.
94. Haard, N.F. 1977. Physiological role of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. In Ori, R.L. and St Angelo, A.J. Eds.. Enzymes in food and beverage processing (ACS Symposium Series. 47). American Chemical Society, Washington D.C. pp. 143-171.
95. Hackett, W.P. 1985. Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Reviews* 7:109-155.
96. Hackett, W.P. 1988. Donor plant maturation and adventitious root initiation. In Adventitious root formation in cuttings. Eds. T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pp. 11-28.
97. Haissig, B.E. 1970a. Performed adventitious root initiation in brittle willow grown in a controlled environment. *Can. J. Bot.* 48:2309-2312.
98. Haissig, B.E. 1970b. Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. *Planta* 95:27-35.
99. Haissig, B.E. 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In Developments in plant and soil sciences Vol. 20 New root formation in plants and cuttings Ed. M.B. Jackson. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp. 141-190.
100. Haissig, B.E. 1990. ATP concentrations in *Pinus banksiana* cuttings during adventitious rooting. *J. Plant Physiol.* 136:499-502.
101. Haissig, B.E.; Davis, T.D. and Reimenschneider, D.E. 1992. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiol. Plant.* 84:310-317.
102. Hames, B. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Gel electrophoresis of protein: A practical approach. ed. Hames, B. IRL Press limited. England. pp. 1-86.
103. Hansen, J. 1987. Influence of gibberellins on adventitious root formation. In Biology of Adventitious Rooting. Haissig, B.E. Ed. 162-173.
104. Hangarter, R.P. and Good, N.E. 1981. Evidence that IAA conjugates are slow release sources of free IAA in plant tissues. *Plant Physiol.* 68:1424-1427.
105. Hartmann, H.T. and Kester, D.E. 1983. Plant Propagation, Principles and Practices. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall inc. 298-342. ISBN-0-13-681007-1.
106. Hartmann, H.T.; Kester, D.E. and Davies, F.T. Jr. 1990. Plant propagation: Principles and practices. 4<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp. 246-247. ISBN 0-13-681007-1.
107. Hasenstein, K.H. and Evans, M.L. 1988. Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mayz*. *Plant Physiol.* 86:890-894.
108. Hausman, J.F., Kevers, C. and Gaspar, T. 1995. Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots in vitro. *Plant Sci.* 110:63-71.

109. Hegedus, P. et Phan, C.T. 1983. Actions de phenols sur les malformations observées chez les porte-greffes de pommiers M-26 et O-3 cultivés in vitro. *Rev. Can. Biol. Exptl.* 42:33-38.
110. Hepler, P.K. and Wayne, R.O. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:397-439.
111. Hess, C.E. 1961. The mung bean bioassay for detection of root promoting substances. *Plant Physiol.* 36:XXI.
112. Hess, C.E. 1962. Characterization of the rooting cofactors extracted from *Hedera helix* L. and *Hibiscus rosa-sinensis* L. *Proceedings 16th Int. Hort. Cong.* 4:382-388.
113. Hess, C.E. 1969. Internal and external factors regulating root initiation. In: *Root Growth* (Ed. by W.J. Whittington) pp 42-64 Butterworths, London.
114. Hinman, R. and Lang, J. 1965. Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry.* 4:144-158.
115. Hoard, G.V.; Hillman, S.K. and Wareing, P.F. 1971. Studies on the movement of indole auxins in willow. *Planta.* 99:73.
116. Hochstrasser, A. C.; James, R. W.; Pometta, D. and Hochstrasser, D. 1990. Preparative isoelectric focusing and high resolution 2-dimensional gel electrophoresis for concentration and purification of low abundance proteins, *Applied and Theoretical Electrophoresis* 1:265-275.
117. Jacobs, M. and Gilbert, S.F. 1983. Basal localization of the presumptive auxin transport carrier in pea cells. *Science.* 220:1297-1300.
118. Jahn, T ; Johansson, F ; Lüthen, H ; Volkmann, D ; Larsson, C. 1996. Reinvestigation of auxin and fusicoccin stimulation of the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Planta* 199(3): 359-365.
119. James, D.J. 1983a. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9. *Physiol. Plant.* 57:149-153.
120. James, D.J. 1983b. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Malus pumila*) II. Uptake and distribution of indole-3-acetic acid during the auxin sensitive phase in M.9 and M.26. *Physiol. Plant.* 57:154-158.
121. James, D.J. and Thurbon, I.J. 1981. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis in vitro in the apple rootstock M.9 and M.26. *Z. Pflanzenphysiol.* 105:11-20.
122. James, D.J. and Thurbon, I.J. 1981. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. *J. Hort. Sci.* 56(1):15-20.
123. Janick, J., Schery, R. W., Woods, F. W. and Ruttan, V. W. 1974. *Plant Science. An Introduction to World Crops.*, 2 ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA. pp 3-25.
124. Jarvis, B.C. 1986. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: M.B. Jackson, ed. *New Root Formation in Plants and Cuttings*, pp. 191-222. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff publishers.
125. Jarvis, B.C. and Booth, A. 1981. Influence of indolebutyric acid, boron, myo-inositol, vitamin D and seedling age on adventitious root development in cuttings of *Phaseolus aureus*. *Physiol. Plant.* 53:213-218.

126. Jarvis, B.C.; Shannon, P.R.M. and Yasmin, S. 1983. Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiol.* 24:677-683.
127. Jarvis, B.C. and Shaheed, A.I. 1986. Adventitious root formation in relation to the uptake and distribution of supplied auxin. *New Phytol.* 103: 23-31.
128. Jarvis, B.C. and Yasmin, S. 1985. The influence of calcium on adventitious root development in mung bean cuttings. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 180:697-701.
129. Jarvis, B.C.; Yasmin, S. and Coleman, M.T. 1985. RNA and protein metabolism during adventitious root formation in stem cuttings of *Phaseolus aureus*. *Physiol. Plant.* 64:53-59.
130. Johannes, E.; Brosnan, J.M. and Sanders, D. 1992. Parallel pathways for intracellular calcium release from the vacuole of higher plants. *Plant J.* 2:97-102.
131. Jones, O. 1976. Effect of phloridzin and phloroglucionol on apple shoots. *Nature.* 262:392-393.
132. Kauss, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:47-72.
133. Kefeli, V. 1978. Natural plant growth inhibitors and phytohormones. Dr W. Junk b.v. Plublishers. The Hague/Boston. 277pp.
134. Kefeli, V.L. and Kadirov, C.S. 1971. Natural Growth inhibitors, their chemical and physiological properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22:185-196.
135. Kenten, R.H. 1955. The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. *Biochem. J.* 59:110-121.
136. Key, J.L. 1989. Modulation of gene expression by auxin. *Bio Essays* 11:52-58.
137. Kim, S.H. and Kim, S.S. 1996. Carbohydrate moieties of three radish peroxidases. *Phytochemistry* 42(2): 287-290.
138. Klapper, M.H. and Hackett, D.P. 1963. The oxidatic activity of horseradish peroxidase. II. Participation of ferropoxidase. *J. Biol. Chem.* 238:3736-3749.
139. Kluesener, B., Boheim, G., Liss, H., Engelberth, J. and Weiler, E.W. 1995. Gadolinium-sensitive, voltage-dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ. *EMBO J.* 14(12):2708-2714.
140. Kokkinakis, D.M. and Brooks, J.L. 1979. Tomato peroxidase. Purification, characterizatio, and catalytic properties. *Plant Physiol.* 63:93-99.
141. Kokkinakis, D.M. and Brooks, J.L. 1979. Hydrogen peroxide-mediated oxidation on indole-3-acetic acid by tomato peroxidase and molecular oxygen. *Plant Physiol.* 64:220-223.
142. Konnings, H. 1965a. The effect of gravity on transverse distribution of auxin in pea roots. *Plant Physiol.* suppl. 40. XXXII.
143. Krul, W.R. 1968. Increased root initiation in pinto bean hypocotyls with 2,4-dinitrophenol. *Plant Physiol.* 43:439-441.
144. Krylov, S. N.; Krylova, S.M. and Rubin, L.B. 1993. Threshold effect of caffeic acid on peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochem.* 33(1):9-12.
145. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.



146. Lambers, H., Scheurwater, I. and Atkin, O.K. 1996. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. in: *Plant Roots The Hidden Half*. 2nd. Ed. Waisel, Eshel and Kafkafi ed. Marcel Dekker Inc. ISBN 0-8247-9685-3.
147. Lanfermeijer, F.C. and Prins, H.B.A. 1994. Modulation of the H<sup>+</sup>-ATPase activity by fusicoccin in plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) Roots. *Plant Physiol.* 104:1277-1285.
148. Larqué-Saavedra, A. y Reyes, R. 1988. El uso de las hormonas vegetales en la agricultura mexicana. *Ciencia y Desarrollo*. 14(82):49-63.
149. Larson, R. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27(4):969-978.
150. Lau, O.; Murr, D.P. and Yang, S.F. 1974. Effect of 2-4 dinitrophenol on auxin-induced ethylene production and auxin conjugation by mung bean tissues. *Plant Physiol.* 54:182-185.
151. Lee, T-M. and Lin, Y-H. 1996. Opposite effects of fusicoccin and IAA on putrescine synthesis of rice coleoptiles. *Physiol. Plant* 97:63-68.
152. Lee, T-M. and Lin, Y-H. 1996. Opposite effects of fusicoccin and IAA on putrescine synthesis of rice coleoptiles. *Physiol. Plant.* 97:63-68.
153. Lee, T.T. 1980. Effect of phenolic substances on metabolism of exogenous indole-3-acetic acid in maize stems. *Physiol. Plant.* 50: 107-112.
154. Lee, T.; Rock, G. and Stoessl, A. 1978. Effects of orchinol and related phenantrenes on the enzymic degradation of Indole-3-acetic acid. *Phytochemistry.* 17:1721-1726.
155. Lee, T.; Starrat, A. and Jevnikar, J. 1982. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: Structure-activity relationships. *Phytochemistry.* 21:517-523.
156. Li, Y., Liu, Z-B. Shi, X., Hagen, G. and Guylfoyle, T.J. 1994. An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters. *Plant Physiol.* 106:37-43.
157. Liu, Z.H., Hsiao, I.C. and Pan, Y.W. 1996. Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid peroxidase and auxin oxidase in hypocotyl cuttings of soybean during root formation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 37(4):247-253.
158. Liu, Z.H., Liu, H.Y. and Wang, H.Y. 1996. Effect of light on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 37(2):113-119.
159. Liu, Z.H.; Hsiao, I. C. and Pan, Y.W. 1996. Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyl cutting of soybean during root formation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 37(4):247-253.
160. Liu, Z.H.; Liu, H.Y. and Wang, H.Y. 1996. Effect of light on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 37(2):113-119.
161. Ludwig-Müller, J. and Epstein, E. 1991. Occurrence and *in vivo* biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.) *Plant Physiol.* 97:765-770.
162. Lüthen, H. and Böttger, M. 1993. Induction of elongation in maize coleoptiles by hexachloroiridate and its interrelation with auxin and fusicoccin action. *Physiol. Plant.* 89:77-86.
163. Malik, K.A. and Saxena, P.K. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta* 184:148-150.

164. Manning, G.S. 1969. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions I. Colligative properties. *J. Chem. Phys.* 51:924-933.
165. Maruyama, S. and Boyer, J.S. 1994. Auxin action on growth in intact plants: treshold turgor is regulated. *Planta* 193:44-50.
166. Mato, M.C.; Rúa, M.L. and Ferro, E. 1988. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 72:84-88.
167. Maurel, C., Leblanc, N., Barbier-Brigoo, H., Perrot-Rechenmann, C., Bouvier-Durand, M. and Guern, J. 1994. Alterations of auxin perception in rolB-transformed tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 105:1209-1215.
168. Mazza, G.; Ricard, J. and Bouchet, M. 1970. Potentiels de demi-réduction et activité "auxine oxydasique" de peroxydases de Navet (*Brassica napus* L.) C.R. Acad. Sci. Paris. 270:2492-2494.
169. Meins, F. and Binns, A.N. 1979. Cell determination in plant development. *BioSci.* 29:221-225.
170. Méndez, J.; Gesto, M.; Vazques, A.; Vietez, E. and Seoane, E. 1968. Growth substances isolated from woody cuttings of *Alnus glutinosa* and *Fraxinus*. *Phytochem.* 7:575.
171. Mennes, A. M., Quint, A., Gribnau, J.H., Boot, C. J. M., Zaal, E. J. van-der, Maan, A.C., Libbenga, K. R. 1992. Specific transcription and reinitiation of 2,4-D-induced genes in tobacco nuclei. *Plant.Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng.* 18 (1):109-117.1992.
172. Merckelbach, C. Buchala, A.J. and Meier, H. 1991. Adventitious rooting in cuttings of *Populus tremula*: Metabolim of IAA and IBA. In *Proceedings of the 14th Int. Conf. on Plant Growth Substances*, Amsterdam, p. 21.
173. Mettler, I. and Leonard, R. 1979. Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* 63:183-190.
174. Meudt, W. J. 1971. Oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzyme. II. Sulfite and manganous ion interaction with intermediate oxidation products. In *Plant Growth Substances* (D.J.Carr De.). Springer Verlag, Berlin, W. Germany. pp. 110-116
175. Meudt, W.J. 1967. Studies of the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 144:118-128.
176. Michalke, W., Katekar, G.F. and Geissler, A.E. 1992. Phytotropin-binding sites and auxin transport in *Cucurbita pepo*: evidence for two recognition sites. *Planta* 187:254-260.
177. Michalkzuk, L., Ribnicky, D.M., Cooke, T.J. and Cohen, J.D. 1992. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* 100: 1346-1353.
178. Michellet, B and Boutry, M. 1995. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. A Highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Phgysiol.* 108:1-6.
179. Miller, P. and Gow, N. 1989. Correlation between profile of ion current circulation and root development. *Physiol. Plant.* 75:102-108.
180. Mitsuhashi-Kato, M. and Shibaoka, H. 1981. Effects of actinomycin D and 2,4-dinitrophenol on the development of root primordia in azuki bean stem cuttings. *Plant and Cell Physiol.* 22: 1431-1436.

181. Mizuno, A. and Katou, K. 1992. Effect of cations on IAA-induced proton excretion in the xylem of *Vigna unguiculata*. *Physiol. Plant.* 85:411-416.
182. Mollan, C.; Donnelly, H. and Harmey, A. 1972. Synthesis of indole-3-acetyl aspartic acid. *Phytochem.* 11:1485-1488.
183. Monteiro, A.M.; Crozier, A. and Sandberg, G. 1988. The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seed and seedlings of *Dalbergia dolichopetala*. *Planta.* 174:561-568.
184. Moore, T.C. 1969. Comparative net biosynthesis of indoleacetic acid from tryptophan in cell-free extracts of different parts of *Pisum sativum* plants. *Phytochem.* 8:1109-1120.
185. Morita, Y.; Kameda, K. and Mizuno, M. 1962. Studies on phytoperoxidase. XVI. Aerobic destruction of indole-3-acetic acid catalyzed by crystalline Japanese radish peroxidase a and c. *Agr. Biol. Chem.* 26:442-446.
136. Mudge, K. W. 1987. Effect of ethylene on rooting in Biology of Adventitious Rooting. Haissig, B.E. Ed. 150-161.
137. Nakono, M.; Kobayashi, S. and Sugioka, K. 1982. Peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. -In oxygenases and oxygen metabolism (M. Nozaki de.) pp.245-254. Academic PRESS, NEW YORK n.y. isbn 0-12-522780-9.
188. Nanda, K.K., Bansal, G.L., Kochhar, V.K. and Battacharya. 1978. Effect of some metabolic inhibitors of oxidative phosphorylation on rooting of hypocotyl cuttings of *Phaseolus mungo*. *Ann. Bot.* 42: 659-663.
189. Nanda, K.K., Bhattacharya, N.C. and Kaur, N.P. 1973. Disc electrophoretic studies of IAA oxidase and their relationship with rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. *Physiol. Plant.* 29:442-444.
190. Nanda, K.K. and Dhawan, A.K. 1976. A paradoxical effect of 2,4-Dinitrophenol in stimulating the rooting of hypocotyl cuttings of *Phaseolus mungo*. *Experientia.* 9:1167-1168.
191. Nanda, K.K., Gurumurti, K. and Chibbar, R.N. 1975. Evidence for the allosteric nature of IAA-oxidase system in *Phaseolus mungo* hypocotyl. *Experientia* 31:635-636.
152. Napier, R.M. 1995. Towards an understanding of ABP1. *J. Exp. Bot.* 46(293):1787-1795.
153. Napier, R. and Venis, M.A. 1995. Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytol.* 129:167-201.
194. Nissen, P. 1985. Dose response of auxins. *Physiol. Plant.* 65:357-374.
195. Nissen, P. 1988. Dose response of cytokinins. *Physiol. Plant.* 74:450-456.
196. Nonhebel, H. Kruse, L.I. and Bandurski, R.S. 1985. Indole-3-acetic acid catabolism in *Zea mays* seeds. Metabolic conversion of oxindole-3-acetic acid to 7-hydroxy-2-oxindole-3-acetic acid-7'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. *J. Biol. Chem.* 260:12685-12689.
197. Nordström, A.-C.; Alvarado Jacobs, F. and Eliasson, L. 1991. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiol.* 96:856-861.
198. Normanly, J.; Slovin, J.P. and Cohen, J.D. 1995. Rethinking Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Plant Physiol.* 107:323-329.

199. Oliver, M.J.; Mukherjee, H. and Reid, D.M. 1994. Alteration in gene expression in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings associated with derooting and formation of adventitious root primordia. *Physiol. Plant.* 90:481-489.
200. Östin, A.; Monteiro, A.M.; Crozier, A.; Jensen, E. and Sandberg, G. 1992. Analysis of indole-3-acetic acid metabolites from *Dalbergia dolichopetala* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 100:63-68.
201. Ockerse, R.J., Waber, J. and Mescher, M.F. 1970. The promotion of IAA-oxidase by GA<sub>3</sub> in terminal pea buds *Plant Physiol.* [Suppl.] 46:47
202. Okamoto, H., Tanaka, Y. and Sakai, S. 1995. Molecular cloning and analysis of the cDNA for an auxin-regulated calmodulin gene. *Plant Cell Physiol.* 36(8):1531-1539.
203. Peters, W.S., Lommel, C. and Felle, H. 1997. IAA breakdown and its effect on auxin-induced cell wall acidification in maize coleoptile segments. *Physiol. Plant.* 100:415-422.
204. Peters, W.S.; Richter, U. and Felle, H.H. 1992. Auxin induced H<sup>+</sup>-pump stimulation does not depend on the presence of epidermal cells in corn coleoptiles. *Planta* 186:313-316.
205. Pilet, P.F. 1957. Variation de l'activité des auxin-oxydases dans les racines du lens. *Experientia.* 13:35.
206. Pluss, R.; Jenny, T. and Meier, H. 1989. IAA-induced adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus Tremula* and formation of 2-indolone-3 acetylaspatic acid, a new metabolite of exogeneously applied indole-3-acetic acid. *Physiol Plant.* 75:89-96.
207. Polle, A., Otter, T. and Seifert, F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106:53-60.
208. Pradet, A. and Raymond, P. 1983. Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34:199-224.
209. Pressey, R. 1990. Anions activate the oxidation of indole acetic by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiol.* 93:798-804.
210. Ramakrishna Kurup, C.K. and Rao Sanadi, D. 1976. Interaction of oligomycin with the pathway of mitochondria energy transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* 176:218-224.
211. Ravel, P. 1986. Uncoupling activity of a series of flavones and flavonols on isolated plant mitochondria. *Phytochem.* 25 (5):1015-1020.
212. Ray, P.M. 1958. Destruction of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 9:81-118. Ray, P.M. 1956. The destruction of indoleacetic acid. II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 64:193-216.
213. Ray, P.M. 1956. The destruction of indoleacetic acid. II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 64:193-216.
214. Ray, P.M. and Thimann, K.V. 1956. The destruction of indoleacetic acid. Action of the enzyme of *Omphalia flavida*. *Arch. Biochem. Biophys.* 64:175-192.
215. Rayle, D.L. and Cleland, R. 1979. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Current Topics in Developmental Biology.* 11:187-214.
216. Rayle, D.L. and Cleland, R. 1992. The acid growth theory of auxin induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99:1271-1274.
217. Reid, R.J. and Smith, F.A. 1992. Regulation of calcium influx in Chara. Effect of K<sup>+</sup>, pH, metabolic inhibition, and calcium channel blockers. *Plant Physiol.* 100:637-643.

218. Reinecke, D. and Bandurski, R. 1988. Oxidation of Indole-3-acetic acid to oxindole-3-acetic acid an enzyme preparation from *Zea mays*. *Plant. Physiol.* 86:868-872.169.
219. Rengel, Z. and Elliot, D.C. 1992. Mechanism of aluminium inhibition of net  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol.* 98:632-638.
220. Rey, M.; Díaz-Sala, C. and Rodríguez, R. 1994. Exogenous polyamines improve rooting of hazel microshoots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36(3):303-308.
221. Ribnicky, D.M., Ilic, N., Cohen, J.D. and Cooke, T.J. 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. *Plant Physiol.* 112:549-558.
222. Ricard, J. and Nari, J. 1967. The formation and reactivity of peroxidase compound III. *Biochim. Biophys. Acta.* 132:321-329.
223. Ricard, J. and Job, D. 1974. Reaction mechanisms of indole-3-acetate degradation by peroxidases. A stopped flow and low-temperature spectroscopic study. *Eur. J. Biochem.* 44:359-374.
224. Richter, C. and Dainty, J. 1990. Ion behavior in plant cell walls. IV. Selective cation binding by *Sphagnum russowii* cell walls. *Can. J. Bot.* 68:773-781.
225. Ridge, I. and Osborne, D.J. 1971. Role of peroxidase when hydroxyproline-rich glycoprotein in plant cell wall is increased by ethylene. *Nature New Biol.* 229:205-208.
226. Riov, J. and Epstein, E. 1988. Comparison of movement and metabolism of Indole-3-acetic acid and Indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. *Physiol. Plant.* 74:556-560.
227. Riov, J. and Yang, S.F. 1989. Enhancement of adventitious root formation in mung bean cuttings by 3,5-dihalo-4-hydroxybenzoic acids and 2,4-dinitrophenol. *Plant Growth Regulation* 8:277-281.
228. Robert, M.L.; Taylor, H.F. and Wain, R.L. 1976. The effect of certain phenolic acids on the growth and ethylene production of cress seedling roots. *Planta* 132:95-96.
229. Roberts, A.M. and Fuchigami, L.H. 1973. Seasonal changes in auxin effect on rooting of Douglas Fir stem cuttings as related to bud activity. *Physiol. plant.* 28:215-221.
230. Roussaux, J. Dizengremel, P. and Chauveau, M. 1986. Inhibition of mitochondrial oxidations by adenine-derivatives and auxin related compounds. *J. Plant Physiol.* 123:55-67.
231. Rubery, P.H. 1981. Auxin receptors. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:569-596.
232. Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1994. **Fisiología Vegetal** 4a. de. Grupo Editorial Iberoamérica México, D.F. pag. 395. ISBN 970-625-024-7.
233. Sánchez-Bravo, J.; Ortuño, A.M.; Botía, J.M.; Acosta, M. and Sabater, F. 1992. The decrease in auxin polar transport down the lupin hypocotyl could produce the indole-3-acetic acid distribution responsible for the elongation growth pattern. *Plant Physiol.* 99:108-114.
234. Sánchez de Jiménez, E.; Albores, M. and Loyola, V.M. 1981. Effect of 2, 4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98:347-353.
235. Sandberg, G. Jensen, E. and Crozier, A. 1984. Analysis of indole-3-carboxylic acid in *Pinus sylvestris* needles. *Phytochem.* 23:99-102.

236. Sankhla, N. and Upadhyaya, A. 1988. Polyamines and adventitious root formation. In *Adventitious root formation in cuttings*. Eds. T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pp. 202-213.
237. Sasaki, K.; Shimomura, K.; Kamada, H. and Harada, H. 1994. IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiol.* 35(8):1159-1164.
238. Saunders, B.C.; Holmes-Siedle, A.G. and Stark, B.P. 1964. Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Butterworths, London. 271 pp.
239. Scheres, B.; McKhann, H.I. and van der Berg, C. 1996. Roots redefined: Anatomical and genetic analysis of root development. *Plant Physiol.* 111:959-964.
240. Schneider, E.A. and Wightman, F. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:487-513.
241. Schumaker, K.S. and Sze, H. 1987. Inositol 1,4,5-triphosphate releases  $Ca^{2+}$  from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.* 262:3944-3946.
242. Sedbrook, J.C.; Kronebusch, P.J.; Borisy, G.G.; Trewabas, A.J. and Masson, P.H. 1996. Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic  $Ca^{2+}$  responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* 111:243-257.
243. Sentenac, H. and Grignon, C. 1981. A model for predicting ionic equilibrium concentration in cell walls. *Plant Physiol.* 68:415-419.
244. Sequeira, L. and Mineo, L. 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.* 41:1200-1208.
245. Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATP-ase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40:61-94.
246. Sevánek, J.; Klicova, S.; Králík, J.; Psota, V.; Vitkova, H.; Kudová, D. and Reinöhl, V. 1991. The effect of paclobutrazol on the level of endogenous IAA in relation to the rooting of cuttings and abscission of petioles. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 187:89-94.
247. Shannon, L.M.; Kay, E. and Lew, J.Y. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and Physical properties. *J. Biol. Chem.* 241:2166-2176.
248. Shiina, T. and Tazawa, M. 1987. Demonstration and characterization of a  $Ca^{2+}$  channel in tonoplast free-cells of *Nitellopsis obtusa*. *J. Membrane Biol.* 96:263-276.
249. Short, K.C. and Torrey, J.G. 1972. Citokynins in seedlings roots of pea. *Plant Physiol.* 49:155-160.
250. Sitbon, F. and Perrot-Rechenmann, C. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant.* 100:443-455.
251. Smalle, J. and Van Der Straeten, D. 1997. Ethylene and vegetative development. *Physiol. Plant.* 100:593-605.
252. Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:117-143.
253. Smith, D.R. and Thorpe, T.A. 1975a. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. *J. Exp. Bot.* 26(91):184-192.
254. Smith, D.R. and Thorpe, T.A. 1975b. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. *J. Exp. Bot.* 26(91):193-202.
255. Smith, D.R. and Thorpe, T.A. 1976. Rooting in cuttings of *Pinus radiata* seedlings: Fluctuations in relation to selection day. *Bot. Gaz.* 137(2):128-132.
256. Subbaiah, C.C., Zhang, J. and Sachs, M.M. 1994. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiol.* 105:369-376.

257. Talwar, G.; Dendsay, J.P.S. and Gupta, V.K. 1985. Kinetic properties of IAA oxidase from mung bean cotyledons. *Phytochemistry* 24(4):673-686.
258. Taylor, C.W. and Marshall, I.C.B. 1992. Calcium and inositol 1, 4, 5 triphosphate receptors: a complex relationship. *Trends Biochem. Sci.* 17:403-407.
259. Terry, B.R.; Findlay, G.P. and Tyerman, S.D. 1992. Direct effects of Ca<sup>2+</sup>-channel blockers on plasma membrane cation channels of *Amaranthus tricolor*-protoplasts. *J. Exp. Bot.* 43(256):1457-1473.
260. Tester, M. 1990. Plant ion channels: whole-cell and single channel studies. *New Phytol.* 114:305-340.
261. Theologis, A. 1986. A rapid gene regulation by auxin. *Ann Rev Plant Physiol.* 37:407-438.
262. Thimann, K. V., and Delisle, A.L. 1939. The vegetative propagation of difficult plants. *J. Arnold Arb.* 20: 116-136.
263. Thimann, K.V. and Delisle, A.L. 1942. Notes on the rooting of some conifers from cuttings. *J. Arnold Arbor.* 23:103-109.
264. Thimann, K.V. 1965. Toward an endocrinology of higher plants In: Recent progress in hormone research. *Acad. Press* 21:579.
265. Thimann, K.V. 1974. Fifty years of plant hormone research. *Plant Physiol.* 54:450-453.
266. Thimann, K.V. 1977. Hormone action in the whole life of plants. University of Massachusetts Press, Amherst. USA ISBN 0-87023-224-X.
267. Tian, H. Klambt, D. Jones, A.M. 1995. Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 270 (45):26962-26969.
268. Torrigiani, P.; Altamura, M.M.; Capitani, F.; Serafini-Fracassini, D. and Bagni, N. 1989. De novo root formation in thin layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiol. Plant.* 77:294-301.
269. Torrigiani, P.; Altamura, M.M.; Pasqua, G.; Monacelli, B.; Serafini-Fracassini, D. and Bagni, N. 1987. Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin layers of tobacco. *Physiol. Plant.* 70:453-460.
270. Tuli, V. and Moyed, H.S. 1969. The role of 3-methyleneoxindole in auxin action. *J. Biol. Chem.* 244:4916-4920.
271. Tuli, V. and Moyed, H.S. 1979. The role of 3-methylenoxindole in auxin action. *J. Biol. Chem.* 2:4916-4920.
272. Tuominen, H.; Sitbon, F.; Jacobsson, C.; Sandberg, G.; Olsson, O. and Sundberg, B. 1995. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol.* 109:1179-1189.
273. Valero, P. and Labrador, E. 1995. Effect of auxin on cell wall glycanhydrolytic enzymes in epicotyls of *Cicer arietinum*. *Physiol. Plant* 93:764-770.
274. Valpuesta, V.; Buckovac, M. 1983. Cherry fruit development: Indole acetic acid oxidase isozymes in the seed. *Physiol Plant.* 58:209-213.
275. Van Huystee, R. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidases biosynthetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:509-538.

276. Van Staden, J. and Harty, A.R. 1987. Cytokinins and adventitious root formation. In Haissig B. E. Ed. *Biology of Adventitious Rooting* 185-201.
277. Vázquez, A. and Mato, M.C. 1991. Effects of hydroxy-benzaldehydes on rooting and indole-3-acetic-oxidase activity in bean cuttings. *Physiol. Plant.* 83:597-600.
278. Weaver, R.J. (1972) *Plant Growth Substances in Agriculture*. 1 ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA, pp 143-172.
279. Weigel, U.; Horn, W. and Hock, B. 1984. Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during adventitious rooting. *Physiol. Plant.* 61:422-428.
280. Wiesman, Z.; Riov, J. and Epstein, E. 1988. Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. *Physiol. Plant.* 74:556-560.
281. Wiesman, Z., Riov, J. and Epstein, E. 1989. Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiol.* 91:1080-1084.
282. Wilkinson y Morris, 1994
283. Yamamoto, K.T. 1994. Further characterization of auxin-regulated mRNAs in hypocotyl sections of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek): Sequence homology to genes for fatty-acid desaturases and atypical late embryogenesis-abundant protein, and the mode of expression of the mRNAs. *Planta.* 192:359-364.
284. Yamazaki, I.; Mason, H.S. and Piette, L. 1960. Identification by electron paramagnetic resonance spectroscopy, of free radicals generated from substrates by peroxidase. *J. Biol. Chem.* 235:2444-2449.
285. Yi, H., Park, D. and Lee, Y. 1996. In vivo evidence for the involvement of fosfolipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. *Physiol. Plant.* 96:359-368.
286. Zavala, M.E. and Brandon, D.L. 1983. Localization of a phytohormone using cytochemistry. *J. Cell Biol.* 97:1235-1239.
287. Zhao, Z.R.; Li, G.R. and Huang, G.Q. 1991. Promotive effect of potassium on adventitious root formation in some plants. *Plant Sci.* 79:47-50.
288. Zheng, X. and van Huystee, R.B. 1992. Anionic peroxidase catalysed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide: A defence system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochem.* 31:1895-1898.
289. Zheng, X. and van Huystee, R.B. 1992. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Sci.* 81:47-56.
290. Zimmerman, P.W. and Wilcoxon, F. 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 7:209-229.