

4 31967



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

F.E.S. IZTACALA

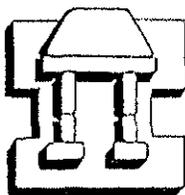
EFFECTO DEL ÁCIDO INDOL-3-ACETICO Y ACIDO INDOL-3-BUTIRICO SOBRE ATPasas-Ca²⁺ DE *Vigna radiata*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN BIOLOGIA DE RECURSOS VEGETALES
PRESENTA:

BIOL. JOSEFINA VAZQUEZ MEDRANO

Director de Tesis: Dr. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO



2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 fue realizado en los laboratorios de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica de la Unidad de Biología y Prototipos de la F.E.S. IZTACALA, bajo la dirección del Dr. Ignacio Peñalosa Castro.

Agradecimientos:

A la Dra. Marina Gavilanes, al Dr. Rafael Moreno y al Dr. Ignacio Peñalosa, sus acertadas sugerencias y su apoyo incondicional durante el desarrollo y la conclusión de esta tesis.

Al Dr. Sergio González Moreno y al Dr. Roberto Velasco García por la revisión crítica de este material y sus valiosas sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio Cesar F., Cesar O., Luis B., Margarita M., Martha S., Martha U. y Rafael Q. con quienes el trabajo es un placer.

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	
AUXINAS	4
RAÍCES ADVENTICIAS	6
ANTECEDENTES	
CALCIO INTRACELULAR	9
CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO	10
TRANSPORTE DE CALCIO	11
ATPasas-Ca ²⁺	15
OBJETIVOS	22
METODOLOGÍA	
AISLAMIENTO DE FRACCIONES MEMBRANALES ENRIQUECIDAS	23
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa POR CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO	25
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa POR HIDRÓLISIS DE ATP CON PIRANINA	26
AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
FORMACIÓN DE RAÍCES CON INHIBIDORES DE ATPasas	28
EFFECTO DE AUXINAS SOBRE ATPasas-Ca ²⁺ <i>in vitro</i>	37
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS	58

ABREVIATURAS

AIA: Ácido indol-3-acético

AIB: ácido indol-3-butírico

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina de suero de bovino

Cam: Calmodulina

DTT: ditioneitol

EDTA: etilendiaminotetracetato disódico

HEPES: ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N-2-etensulfónico

ITP: inosín trifosfato

PIRANINA: 8-hidroxi-1,3,6-piranosulfonato

TCA: ácido tricloroacético

RESUMEN

En células vegetales, el calcio juega un papel importante en el mecanismo de respuesta a varias señales externas y hormonales, ya que al aumentar su concentración en el citoplasma se desencadenan cascadas enzimáticas que promueven diversas respuestas fisiológicas.

La formación de raíces adventicias inducida por auxinas involucra respuestas génicas y metabólicas en las que el calcio participa como segundo mensajero. Dentro de los mecanismos que regulan la concentración de calcio citosólica se encuentran los canales iónicos y las ATPasas- Ca^{2+} de distintos compartimentos celulares. Aún cuando existen controversias, los reportes sugieren que las auxinas modifican la actividad de ATPasas- Ca^{2+} para incrementar la concentración de calcio en el citosol, estimulando la formación de raíces adventicias. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la participación de ATPasas- Ca^{2+} en el mecanismo de formación de raíces adventicias promovido por auxinas. Para este fin se purificaron membranas de mitocondria, plasmalema, tonoplasto y retículo endoplásmico por centrifugación diferencial y ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, y se determinó la actividad de ATPasa mediante la cuantificación de fosfato libre por el método modificado de Taussky y Shorr.

La actividad de ATPasa se midió en presencia de inhibidores de otras posibles ATPasas contaminantes y condiciones óptimas previamente determinadas (como pH, temperatura, tiempo de incubación, distintas concentraciones de sustratos y moduladores).

El ácido indol-3-acético y el ácido indol-3-butírico no mostraron un efecto significativo sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa mitocondrial, pero inhibieron en un 50 % la actividad de ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema, un 40 % la de tonoplasto y un 30 % la de retículo endoplásmico. Estos resultados sugieren una disminución en la extrusión de calcio al espacio extracelular, así como un retardo en la compartimentalización en la vacuola y el retículo, que son los principales reservorios de calcio en la célula; esto podría ocasionar un incremento en la concentración de calcio citosólico, que a su vez desencadenaría cascadas enzimáticas involucradas en la promoción rizogénica.

INTRODUCCION

La producción de raíces adventicias es uno de los factores críticos en la reproducción asexual de plantas y es un proceso que cobra gran importancia cuando se requiere propagar una especie sin que se pierdan sus caracteres genéticos por causa de la segregación característica de la reproducción sexual. Por ello es importante entender los mecanismos por los que la planta logra la formación de dichas raíces. Desde la década de los años 30's, se ha determinado que las hormonas, y en particular las auxinas, tienen una participación relevante en la promoción radicular (Salisbury y Ross, 1994).

El término auxina proviene del griego "auxen" que significa incrementar. Estas sustancias producen diversos efectos en el desarrollo y morfogénesis, promueven la elongación de la radícula y la división celular y juegan un importante papel en las respuestas al crecimiento unidireccional ocasionado por un estímulo lamados tropismos (Taiz y Zeiger, 1998).

Las auxinas presentes en plantas son el ácido indol-3-acético (AIA) cuyos efectos se conocen más que el de otras auxinas; el ácido 4-cloroindolacético (4-CI-AIA), que se encuentra en semillas jóvenes de varias leguminosas (Engvild, 1986); el ácido fenilacético (PAA), que con frecuencia es más abundante que el AIA, aunque mucho menos activo (Wightman y Lighty, 1982; Lueba y LeTorneau, 1990), y el ácido indol-3-butírico (AIB) presente en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas, fig. 1, (Schneider *et al.*, 1985; Epstein *et al.*, 1989).

También existen algunos compuestos sintéticos que ocasionan respuestas fisiológicas comunes al AIA, como el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) (Salisbury y Ross, 1994).

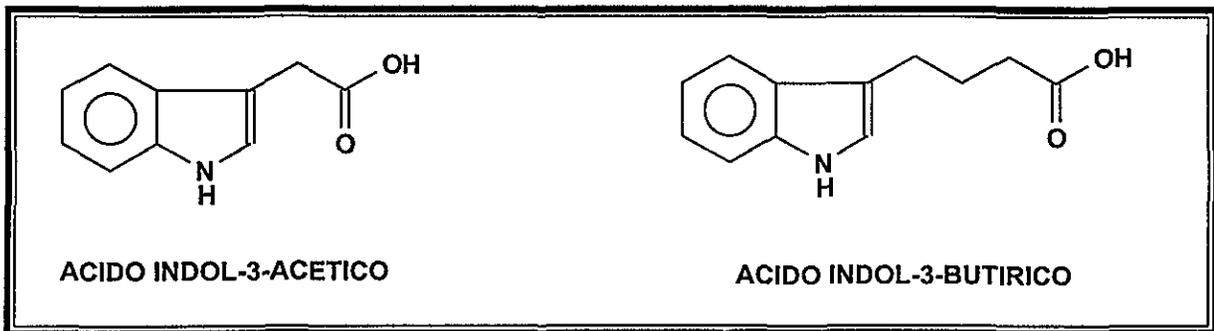


Fig. 1.- Estructura de las moléculas con actividad auxínica.

El AIA es sintetizado en el meristemo apical y es transportado hacia tallos y raíces; su acción depende del estado de desarrollo del órgano o tejido, de su concentración y de la proporción a la que se encuentre con respecto a otros fitorreguladores. A pesar de los pocos estudios realizados con el AIB, se ha establecido su mayor capacidad para inducir la formación de raíces adventicias, por lo que se utiliza con frecuencia como enraizador comercial (Salisbury y Ross, 1994).

La regulación de los niveles de auxina en la planta depende de la tasa de síntesis, de la velocidad de transporte, de la formación de conjugados y de la tasa de degradación del compuesto.

Como toda hormona, las auxinas deben ser transportadas de un órgano o tejido a otro. El AIA suele translocarse a través de células parenquimatosas que se encuentran en contacto con haces vasculares. El movimiento de auxinas es lento en raíces y tallos: 1 cm h^{-1} , aunque es 10 veces más rápido que si sólo se transportara por difusión. El transporte de auxinas es polar, en tallos se presenta de manera preferencial en sentido basipétalo (Alón, 1987).

El transporte de la auxina requiere energía metabólica, pues es susceptible a los inhibidores de la síntesis de ATP o la carencia de oxígeno. Otros inhibidores del transporte polar de auxinas son el ácido 2,3,5-triyodobenzóico (TIBA) y el ácido naftiltalámico (NPA), que interfieren directamente en el transporte, por lo que se les conoce como antiauxinas. Además el transporte de auxinas depende de la participación de calcio (Jarvis y Yasmin, 1985).

Las plantas poseen un sistema que les permite formar conjugados auxínicos, en donde el grupo carboxilo del AIA se combina de manera covalente con otras moléculas, para formar derivados como la amida del ácido indolacetilaspártico y los ésteres del AIA-inositol y del AIA-glucosa (Cohen y Bandurski, 1982; Caruso, 1987). En general las plantas pueden liberar AIA a partir de estos conjugados mediante hidrolasas, lo que sugiere que los conjugados son una forma de almacenamiento de AIA. Los conjugados también pueden ser formas más fácilmente transportables (Caruso, 1987).

La planta también cuenta con sistemas para degradar al AIA; uno de ellos implica la oxidación por O₂ y la pérdida del grupo carboxilo en forma de CO₂. Los productos son variables, pero casi siempre el 3-metilenoxindol es el principal. Esta actividad se ha denominado como AIA oxidasa y reside en enzimas que también tienen actividad de peroxidasa (Savitsky *et al*, 1999). Existen varias isoenzimas de AIAoxidasa, siendo la mayoría de ellas semejantes a las peroxidasas implicadas en la formación de lignina.

Las auxinas sintéticas así como las auxinas conjugadas, no son degradadas activamente por estas oxidasas, por lo que se considera que permanecen más tiempo en la planta que el AIA.

Estas hormonas promueven la producción de raíces adventicias a concentraciones de 10⁻⁷ a 10⁻¹³ M, dependiendo de la especie y la edad del vegetal. En particular, promueven la elongación de raíces en tallos de especies leñosas, las cuales

poseen primordios de raíces adventicias que están latentes. Dichos primordios con frecuencia se encuentran en los nudos o en los lados inferiores de los tallos que se localizan entre los nudos y aún en el caso de que los tallos carezcan de primordios, forman raíces adventicias, lo cual es una consecuencia de la división de una capa externa del floema (Salisbury y Ross, 1994; Viesser y col, 1995; Jarvis y Yasmin, 1985).

La formación de raíces adventicias en segmentos de tallo y hoja comprende 4 etapas: a) desdiferenciación, b) inducción, c) diferenciación y d) elongación.

El periodo de determinación durante el cual los órganos se inducen por el balance de reguladores del crecimiento para seguir una vía de desarrollo particular, puede ocurrir mediante dos vías:

1. involucra la formación directa de primordios de raíz a partir de células asociadas o próximas al sistema vascular, y
2. formación indirecta de raíces adventicias con un periodo intermedio de divisiones de células indiferenciadas. Las especies de difícil enraizamiento siguen este patrón.

En la inducción de raíces *in vitro* el tejido se vuelve competente (capaz de reaccionar a las auxinas) y después de una incubación prolongada con auxinas, el tejido se vuelve determinado y el proceso de formación de raíces se inicia. Se requiere una alta concentración de auxina sólo durante la fase de iniciación y el crecimiento, posteriormente este es inhibido por altas concentraciones de auxinas, por lo que en la fase de emergencia se hace un transplante a un medio sin auxinas o se aplica luz y riboflavina para oxidar la auxina (Gorst *et al*, 1983).

No se conocen las acciones específicas desencadenadas por las auxinas y que deben realizarse de forma organizada para permitir la diferenciación del tejido.

Se sabe que hay una activación de genes después de la aplicación exógena de auxinas. Se ha asociado un receptor (ABP) con la respuesta a auxinas, del cual se ha determinado la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia del DNA que la codifica. Esta proteína parece ser un homodímero compuesto por dos polipéptidos de unos 20 kDa cada uno. Este supuesto receptor existe sobre todo en el retículo endoplásmico, pero también se encuentra cerca de la superficie externa de la membrana plasmática (Napier y Venis, 1990).

En diversos experimentos se ha determinado que la formación de raíces no depende de la aplicación exógena de auxinas, lo cual indica que la hormona se sintetiza en el tejido de manera suficiente para cubrir sus necesidades. Además, se ha demostrado que los ácidos indol-3-ácetico e indol-3-butírico estimulan la iniciación de raíces en cortes de tallos. Se ha probado también el efecto de conjugados sintéticos en la promoción de raíces adventicias, con resultados superiores a los encontrados con hormonas naturales, debido probablemente a que los conjugados resisten la degradación enzimática (Salisbury y Ross, 1994).

ANTECEDENTES

La aplicación exógena de calcio estimula la formación de raíces laterales en hipocotilos de frijol mungo (Jarvis y Yasmin, 1985).

Los cambios en la concentración de calcio citosólico están involucrados en la respuesta de células vegetales a varias señales externas y hormonales. El papel del calcio como segundo mensajero es posible no sólo por la apertura y cierre de canales de calcio, sino también por la fina regulación del transporte activo.

Se ha demostrado que diferentes respuestas de las células vegetales involucran cambios locales o globales en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre (Tester, 1990). Sievers y Busch (1992) reportaron que al tratar raíces de berro con inhibidores de las ATPasas transportadoras de calcio presentes en retículo endoplásmico, la curvatura provocada por la respuesta gravitrópica se inhibió drásticamente, indicando que los cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} deben constituir la señal necesaria para la gravirrecepción.

En maíz la fosforilación de varios polipéptidos (de membrana y solubles) fue promovida por la adición de Ca^{2+} y se incrementó en presencia de calmodulina (Veluthambi y Poovaiah, 1984). Más recientemente, Verhey y colaboradores (1993) han caracterizado cinasas de membrana plasmática que requieren calcio, aisladas de plántulas de calabaza. Honda *et al.*, en radículas de soya (1994) encontraron una cinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos que no se parece a la de mamífero pues carece de estimulación por el ester de forbol.

Las evidencias, aunque hasta ahora escasas, de la presencia y la actividad de los elementos que participan en la modulación covalente por fosforilación/defosforilación de proteínas sugieren la existencia de un sistema similar al que se ha caracterizado en animales.

Overvoorde y Grimes (1994) reportaron que la formación de embriones en zanahoria disminuyó cuando la concentración de calcio en el medio se encontraba por debajo de un umbral de 200 μM . Los bloqueadores de canales de calcio, verapamil y nifedipina, así como el ionóforo A23187, inhibieron la formación de dichos embriones, sugiriendo que el Ca^{2+} exógeno o el mantenimiento de los gradientes de este ion se requieren para el desarrollo apropiado del embrión. En este mismo trabajo se indica que la calmodulina activada (el complejo CaM-Ca^{2+}) está localizada en las regiones meristemáticas de los embriones en desarrollo.

Se ha demostrado que el Ca^{2+} actúa intracelularmente como una molécula señal tanto en plantas como en animales (Marmé, 1985; Hepler y Wayne, 1985, Gilory, Blowers y Trewabas, 1986; Allan y Trewabas, 1987; Kauss, 1987).

En los tejidos vegetales, el ión calcio se encuentra presente en el citosol en concentraciones submicromolares y en compartimentos extracitosólicos en concentraciones milimolares. 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 velocidad de flujo de Ca^{2+} entre reservorios internos o externos y el citosol.

El cambio resultante en la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol representa la señal capaz de regular la actividad de las enzimas blanco respectivas, expresándose en un efecto fisiológico (Kauss, 1987), como se esquematiza en la figura 2.

El control del calcio intracelular es mediado por un conjunto de canales que dependen de un potencial electroquímico de calcio ($\mu_{\text{Ca}^{2+}}$) que existe a través de la membrana plasmática, del tonoplasto y del retículo endoplásmico. Los gradientes de calcio a través de estos organelos son generalmente estables, sin embargo ocurren cambios durante la transducción de señales.

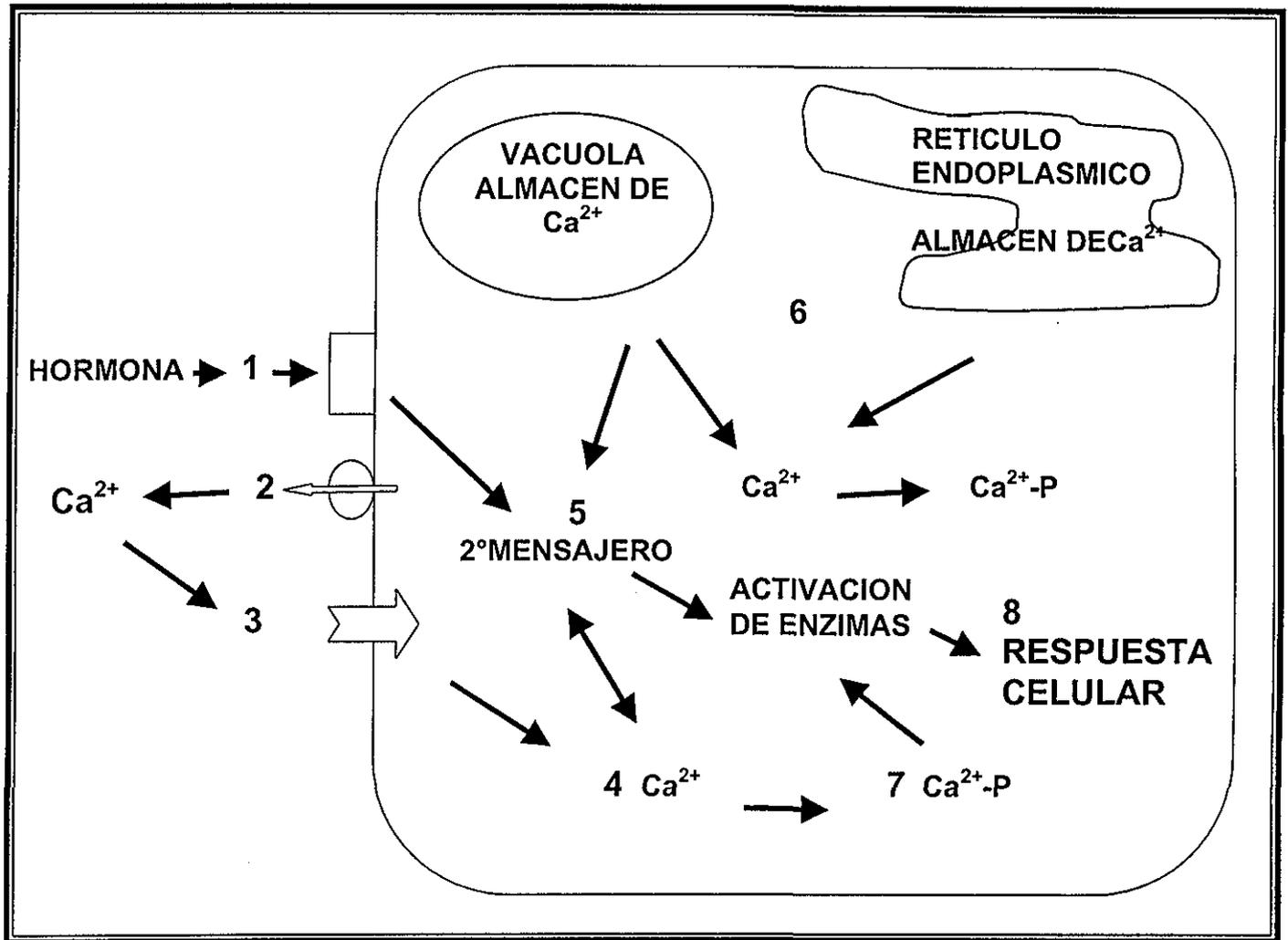


Fig. 2. Elementos del transporte y homeostasis de calcio asociados a respuestas celulares inducidas por señales hormonales en una célula vegetal hipotética. La fitohormona (1) es percibida por un receptor en la membrana plasmática. La percepción de la hormona puede ocasionar cambios en la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} (2) o de canales y acarreadores (3), resultando en cambios, usualmente incremento en la concentración de calcio en el citosol (4). Alternativamente, la hormona puede provocar un segundo mensajero (5) como el calcio citosólico, o el IP_3 relacionado con el almacén de calcio intracelular (6). El incremento en la concentración de calcio citosólico activa proteínas que unen calcio (7) y estas proteínas activan enzimas que inician una cadena de eventos en cascada que dirige una respuesta celular específica (8). Modificado de Bethke *et al*, 1995.

Existen gradientes menores entre el citosol, los cloroplastos y las mitocondrias, pero los cambios en ellos también involucran cambios en la actividad fotosintética y respiratoria, (Terry, *et al.* 1992).

El potencial eléctrico a través de la membrana plasmática es de entre -150 y -200 mV y la diferencia resultante del potencial de membrana de calcio calculado mediante la ecuación de Nernst es de -45 a -60 kJ · mol⁻¹ (Geisler *et al.*, 2000). Por lo que se requiere energía para remover el Ca²⁺ del citosol en contraste con la entrada que es a través de canales pasivos (Sanders *et al.*, 1999).

Funcionalmente estos transportadores se dividen en dos clases: los que median la entrada (como los canales de calcio) y los que median la salida de calcio (como las ATPasas-Ca²⁺ y los antiportadores de Ca²⁺/ H⁺). Estas moléculas se distribuyen asimétricamente en el plasmalema, retículo endoplásmico, tonoplasto, mitocondria y plástidos; el control de su actividad puede ser influenciado por cambios en el gradiente eléctrico a través de las membranas biológicas (Terry *et al.*, 1992), fig. 3.

Los canales permeables a los iones calcio en cualquiera de estas membranas pueden activarse por un rápido incremento en la concentración citosólica de iones calcio (Terry *et al.*, 1992). En células internodales de *Chara* se ha descrito un influjo que oscila entre 0.2 y 0.7 nmoles m⁻²s⁻¹, el cual se incrementa a 2 nmoles m⁻²s⁻¹ en soluciones con alta concentración de calcio y al doble de este último valor en soluciones con potasio elevado. Los resultados sugieren 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 y plástidos de plantas excepto que son capaces de acumular calcio del citosol (Evans, 1988).

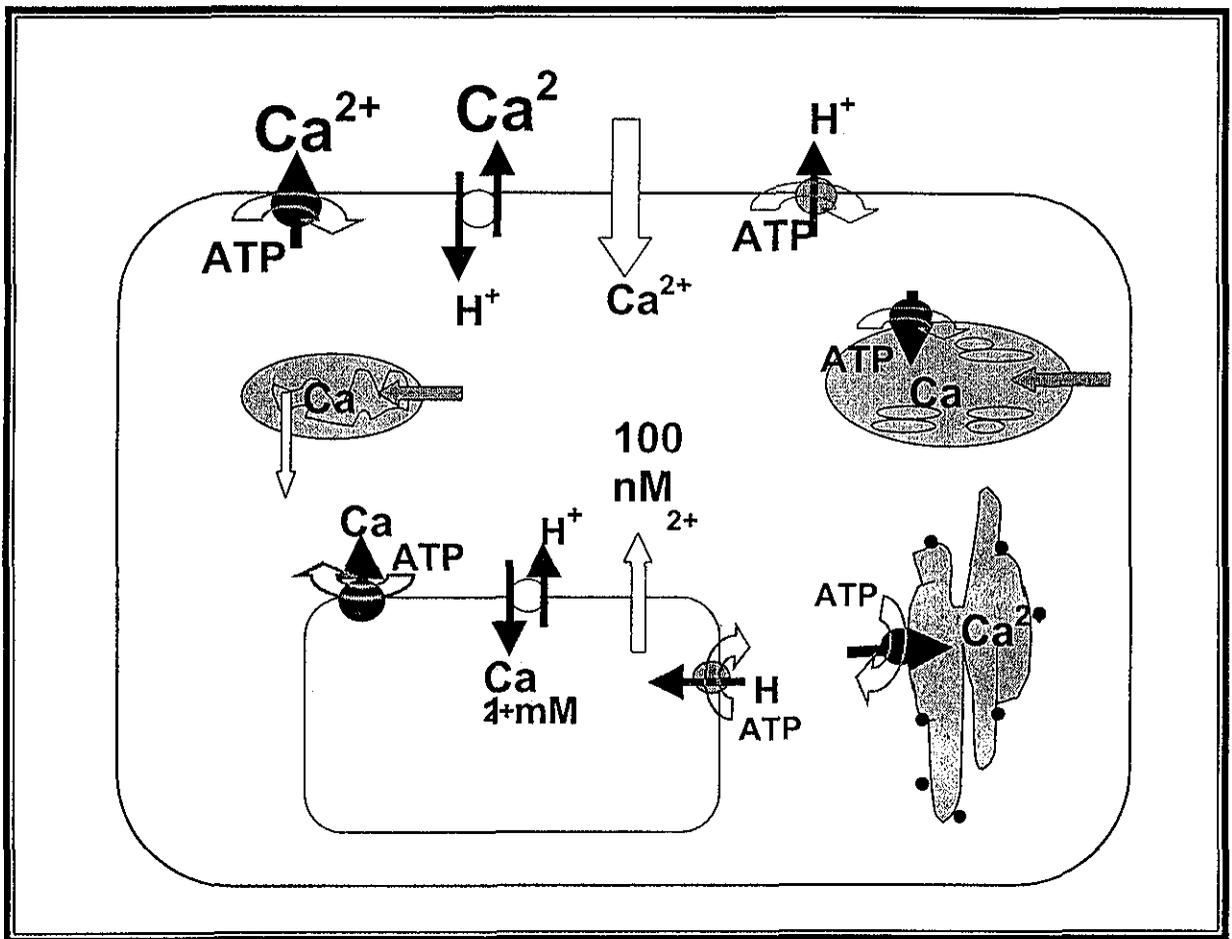


Figura 3. En la figura se observan el tipo y la localización de los transportadores involucrados en mantener la homeostasis de calcio citosólico en células vegetales. Se representa también la participación del bombeo de protones en el transporte de calcio. La ATPasa-H⁺ genera un potencial de membrana negativo (típicamente -150 mV). La expulsión de calcio al medio extracelular depende principalmente de una ATPasa-Ca²⁺ y en segundo lugar de un antiportador nH⁺/Ca²⁺ que utiliza el gradiente electroquímico generado por la ATPasa-H⁺. En la membrana plasmática también existen canales permeables al calcio que permiten su incorporación a la célula, uno de ellos activado por depolarización de la membrana. El sistema de transporte en tonoplasto incluye una ATPasa-Ca²⁺ que incorpora calcio a la vacuola en contra del gradiente de concentración. Existe también una ATPasa-H⁺ que genera un potencial de membrana positivo en el interior de la vacuola (entre +20 y +50 mV), que es utilizado por un

antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ que incorpora calcio a la vacuola y dos tipos de canales que permiten la salida de calcio hacia el citosol uno estimulado por IP_3 y otro dependiente de voltaje. En el retículo endoplásmico se encuentra una ATPasa-Ca^{2+} que incorpora calcio hacia las cisternas. En el cloroplasto se encuentra una ATPasa-Ca^{2+} y un uniportador que utiliza la energía generada en el transporte fotosintético para incorporar calcio al estroma. En la mitocondria se encuentra otro uniportador que incorpora calcio a la matriz mediante el la energía generada en el transporte oxidativo y un canal que permite la salida de calcio hacia el citosol. Modificado de Askerlund y Sommarin, 1996.

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 el tonoplasto 2 clases de canales de calcio. Un tipo es activado por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) tanto en vesículas aisladas (Schumaker y Sze, 1987) como en vacuolas completas (Alexander *et al*, 1990). Se asemejan a los canales de retículo endoplásmico de células animales en que son inhibidos por heparina, para la que tienen gran afinidad (Brosnan y Sanders, 1990).

El otro tipo es dependiente de voltaje, es insensible al IP_3 y se caracteriza también porque el Zn^{2+} y el Gd^{3+} son inhibidores efectivo del flujo (Johannes *et al.*, 1992). Es relativamente poco lo que se conoce sobre canales de calcio de plasmalema en 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 que 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).

El canal de calcio que reportan Kluesener y colaboradores (1995) se encuentra en el retículo endoplásmico de *Bryonia dioica* es dependiente de voltaje y es bloqueado por Gd^{3+} . El gradiente eléctrico puede ser afectado por la actividad respiratoria o incluso por la acción de auxinas que tiene 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 ATPasas protónicas son las enzimas responsables de la homeostasis de la concentración de protones. Su función es utilizar el gradiente electroquímico de protones para la formación de ATP, el cual puede ser utilizado por otras bombas iónicas y la energía liberada en la hidrólisis servirá para el movimiento de iones o nutrientes. Las ATPasas protónicas pueden dividirse en 3 clases:

a) la ATPasa tipo Membrana Plasmática (tipo P), que opera vía un intermediario enzima-fosfato covalente como parte de una bomba iónica y es inhibida por vanadato. La función de esta ATPasa es secretar protones y con ello mantener una diferencia de pH, ácido en el exterior de la célula y un potencial negativo en el interior. Estas son muy similares a las ATPasas de Na^+/K^+ , de K^+ y de Ca^{+2} y se les confiere un origen evolutivo común (Serrano, 1990).

b) las ATPasas tipo Eubacteria (tipo F), que se encuentran en membrana de mitocondria, cloroplasto y plasmalema de procariontes, funcionan con un intermediario enzima-fosfato no covalente y este fosforila al ADP a expensas de la Fuerza protonmotriz formada por el transporte electrónico oxidativo o fotosintético. Son inhibidas por dicitclohexilcarbodimida y azida y por oligomicina solamente la mitocondrial.

c) las ATPasas de tipo vacuolar (tipo V) que funcionan en el control del bombeo de protones dentro de organelos de sistema vacuolar por un mecanismo desconocido que posiblemente no involucre a un intermediario enzima-fosfato covalente. Sensibles a nitrato (Nelson, 1988).

Durante mucho tiempo no había sido posible medir cambios en la concentración de calcio citosólica, según lo reporta Kauss, 1987. Actualmente se sabe que varias respuestas de las células vegetales involucran cambios previos en la concentración citosólica de calcio libre (Tester, 1990). Se han empleado microelectrodos sensibles, fotoproteínas y quelantes fluorescentes sensibles al calcio, llegándose a establecer por estos medios, los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Terry *et al.*, 1992). Sin embargo, aún permanece la incertidumbre acerca de las fuentes que son responsables de la elevación de la concentración citosólica de los iones calcio.

Se mantiene una concentración citosólica de Ca^{2+} de 0.1 μM gracias al transporte a través de diferentes sistemas membranales, que incluyen el tonoplasto, el retículo endoplásmico, las envolturas de plástidos y mitocondrias y la membrana plasmática.

Las bombas de calcio son ATPasas tipo P, que ya han sido clonadas y muestran homología con las ATPasas de retículo de mamíferos (Geisler *et al.*, 2000).

El principal transportador de Ca^{2+} de la membrana plasmática es la ATPasa- Ca^{2+} , que muestra muchas similitudes con su equivalente en células de mamífero. Este transportador ha sido purificado a partir de coleoptilos de maíz, está formada por un solo polipéptido con una masa de 140 kDa. La masa molecular estimada para la enzima de rábano es de 133 kDa (Rasi-Caldongo *et al.*, 1995). Tiene una estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ cercana a uno. Durante su ciclo catalítico forma un

intermediario fosforilado, por la transferencia del fosfato gama del ATP a un residuo específico de ácido aspártico y su actividad es inhibida por el ortovanadato, por lo que esta enzima ha sido clasificada dentro del grupo de las ATPasas tipo P. Se ha observado en varias especies diferente sensibilidad de la ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema a la calmodulina (Kurosaki, 1997).

Una dificultad para registrar la actividad de esta bomba es distinguir su actividad de la ATPasa- H^+ . Este problema se ha resuelto parcialmente sustituyendo al ATP por ITP o GTP, ya que la ATPasa- Ca^{2+} tiene una afinidad semejante por estos sustratos a diferencia de la ATPasa- H^+ (Carnelli *et al.*, 1992).

La K_m aparente estimada para ATP se encuentra en un rango de 4-300 μM y los valores más bajos se han obtenido en presencia de un exceso de Mg^{2+} . La K_m aparente para calcio está en el rango de 0.4-8 μM . El pH óptimo para su actividad se ha determinado entre 7.2 y 7.8 (Sommarin y Somarin, 1996).

La ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema se caracteriza por mostrar alta sensibilidad a derivados de fluoresceína iodada como la eritrosina B. Se asume que este inhibidor modifica un residuo de lisina, causando una inhibición de la unión de ATP (Serrano, 1990); cabe destacar que las ATPasas de membranas intracelulares son menos sensibles. La bomba de Ca^{2+} de plasmalema es sensible a ortovanadato, indicando la formación de un intermediario fosforilado covalentemente durante el ciclo catalítico. La potencia del ortovanadato depende de la composición iónica del medio y de la concentración de ATP, reportándose valores de DI_{50} entre 2-500 μM (Serrano, 1990).

Tabla 1. transportadores de Ca^{2+} de vesículas de membrana plasmática.

Tejido/especie	$K_m\text{ATP}$ $K_m\text{Ca}^{2+}$ μM	Calmodulina	M. Mol. kDa	pH óptimo
Raíz de betabel	0.37	Estimula 2X	124	7-7.5
Hoja <i>Commelina communis</i>	300 4.4	No estimula	n.d.	7.2
Raíz <i>Arabidopsis thaliana</i>	15	Estimula 1.5X	n.d.	6.9-7.5

n.d. - no determinada. Modificado de Evans y Williams(1998); Geisler *et al* (2000).

El retículo endoplásmico de las plantas superiores también tiene una ATPasa- Ca^{2+} , que incorpora a este organelo calcio desde el citosol además de la actividad del antiportador calcio/protón (Evans; Briars y Williams, 1991).

La ATPasa- Ca^{2+} de retículo endoplásmico es similar a la del plasmalema, pero hidroliza ITP o GTP en un 25-50% con respecto al ATP. La K_m aparente para ATP se encuentra entre 70 y 400 μM y los valores de K_m para calcio de 0.1 a 7.5 μM , similares a los de la bomba del plasmalema. Se reportó un pH óptimo entre 6.8 y 7.5 (Bush, 1995).

Al igual que la ATPasa- Ca^{2+} del plasmalema, la de retículo endoplásmico se inhibe con vanadato y eritrosina B. Sin embargo, la sensibilidad a eritrosina B es por lo menos diez veces menor. El intermediario fosforilado aislado de betabel tiene una masa de 119 kDa y es sensible a hidroxilamina (Thomson *et al*, 1993).

Tabla 2. Transportadores identificados en retículo endoplásmico.

Tejido/especie	K_mCa^{2+} μM	Calmodulina	M. Mol. KDa
Raíz de betabel	7.5	No estimula	96
Raíz de betabel ^a	0.92	n.d.	119
Céls. Susp. Zanahoria	n.d.	Estimula 3-4X	120
Coleoptilos de maíz	n.d.	Estimula	102

n.d. - no determinada. ^a otro autor. Modificado de Evans y Williams (1998)); Geisler *et al* (2000).

Empleando gradientes de sacarosa se consigue separar perfectamente dos fracciones que corresponden a la ATPasa- Ca^{2+} del plasmalema y a la del retículo endoplásmico usando marcadores membranales específicos (Hsieh *et al.*, 1991).

Se ha sugerido que la vacuola y el retículo endoplásmico son los principales reservorios de calcio en la célula que podrían liberarlo durante la transducción de señales. El calcio es transportado a través del tonoplasto por un antiportador H^+/Ca^{+2} que utiliza la diferencia de potencial electroquímico y tiene una baja afinidad por calcio. Además, existe una ATPasa- Ca^{2+} con una alta afinidad por calcio y es estimulada por calmodulina (Evans *et al.*, 1991).

La diferencia de potencial para el Ca^{+2} a través del tonoplasto se ha calculado entre 28 y 34 $kJ mol^{-1}$. La concentración de calcio vacuolar es aproximadamente $1 \times 10^{-3} M$. Asimismo, se ha observado que el movimiento de calcio en el retículo es sumamente rápido (Evans y Williams, 1998).

Tabla 3. ATPasas de Ca²⁺ identificadas en tonoplasto.

Tejido/especie	K _m ATP K _m Ca ²⁺ μM	Calmodulina	M. Mol. kDa	pH óptimo	
Células. Susp. Zanahoria	n.d.	n.d.	Estimula	120	n.d.
Fruto de manzana	n.d.	43	Estimula	n.d.	6.7
Flores de coliflor	n.d.	2 (+C)	Estimula	110	7.2

n.d.-no determinada, C-calmodulina. Modificado de Evans y Williams (1998); Geisler *et al* (2000).

La incorporación de calcio por la mitocondria puede participar también en la regulación de calcio citosólico, ya que este acarreador tiene 10 veces más afinidad por calcio que el retículo endoplásmico. El mecanismo de entrada de calcio a la mitocondria difiere entre especies en algunas especies participa un simple transportador y en otras ocurre un cotransporte con fosfato. El calcio libre en la matriz difiere entre especies desde 60 hasta 600 nM (Zottini y Zannoni, 1993). En contraste otras investigaciones empleando isotopos reportan una Km de 30 μM (Muto, 1992).

La salida de calcio de la mitocondria en plantas es casi desconocido, es independiente de sodio y fosfato e insensible a mersalyl (Silva *et al.*, 1992) . Cambios en la concentración de calcio en el citosol pueden relacionarse con el metabolismo oxidativo en respuesta a un incremento en la demanda de energía (Askerlund y sommarin, 1996).

El transporte de calcio al cloroplasto está asociado al transporte electrónico. La concentración de calcio libre y unido a moléculas varía entre 4 y 23 mM, mientras que en el estroma puede encontrarse desde 2.4 hasta 6.3 μM. (Evans *et al.*, 1991).

Las ATPasas tipo P también influyen en el crecimiento celular. De acuerdo con la hipótesis de crecimiento por acidificación (Rayle y Cleland, 1977), las auxinas activan el flujo protónico, provocando la relajación de la pared celular, mediante la ruptura de enlaces en pH ácido o por la activación de enzimas que rompen la pared.

Esto ocasiona una modificación de la turgencia, por lo que se sugiere que las ATPasas tendrían que compensar la presión celular que acompaña la elongación, participando las ATPasas- H^+ de plasmalema y tonoplasto (Michelet y Boutry, 1995).

Las auxinas incrementan la fluidez de las membranas de retículo endoplásmico y de la membrana plasmática, por lo que aceleran los procesos de exocitosis. Las auxinas también inducen un rápido incremento en la actividad de ATPasa- H^+ de la membrana plasmática, acelerando el transporte iónico probablemente involucrado en la inducción de otros procesos (Michelet y Boutry, 1995).

Existe controversia acerca del efecto de las auxinas sobre la ATPasa protónica de membrana plasmática, ya que algunos autores indican que las auxinas no tienen efecto directo sobre la ATPasa, sino que modifican la permeabilidad de la membrana a protones (Szponarski *et al.*, 1991; Santoni *et al.*, 1990), pero otros señalan que existen receptores de auxina en la membrana plasmática asociados a la ATPasa- H^+ , y que esta es estimulada por auxinas (Barbier-Brygoo *et al.*, 1989). También se ha reportado que el AIA estimula la incorporación de la ATPasa- H^+ en la membrana plasmática (Jahn *et al.*, 1996).

Como puede verse, los gradientes de calcio y protónicos juegan un importante papel en la regulación del mecanismo de acción de las auxinas y por ello pueden estar involucrados en la rizogénesis. De ahí que sea importante analizar la participación de las ATPasas, particularmente la ATPasa- Ca^{+2} del plasmalema, la del retículo endoplásmico, y la de tonoplasto así como la ATPasa- H^+ de la mitoconria en el proceso de formación de raíces secundarias ya que estas enzimas pueden modificar los niveles iónicos del citosol provocando respuestas específicas.

Las ATPasas de membranas biológicas juegan un papel importante en la regulación iónica, por lo que fue el propósito del presente trabajo determinar si las ATPasas- Ca^{+2} están involucradas en la elevación del calcio citosólico mediado por auxinas durante la formación de raíces adventicias.

Objetivo general

Evaluar el efecto de las auxinas en la actividad de ATPasas- Ca^{2+} de hipocotilos de frijol mungo (*Vigna radiata*).

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de algunos inhibidores de ATPasas sobre la formación de raíces adventicias en hipocotilos de frijol mungo.
- Aislar fracciones enriquecidas de ATPasas- Ca^{2+} de plasmalema, retículo endoplásmico y tonoplasto y ATPasa- H^{+} de mitocondria de hipocotilos de frijol mungo.
- Evaluar la actividad de las ATPasas en presencia de AIA y AIB.

Para cumplir los objetivos planteados se empleó la siguiente metodología:

MATERIALES Y METODOS

OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon 100 g de semillas de frijol mungo previamente tratadas con hipoclorito comercial (al 3 %) durante 30 minutos. Posteriormente las semillas fueron lavadas con agua corriente y se mantuvieron en agua durante 24 h para su hidratación; transcurrido este tiempo, se trasladaron a una cámara en obscuridad a 30° C y humedad relativa de 70%, agregando sobre ellos agua destilada para recuperar la pérdida por evaporación, durante 4 días.

BIOENSAYO

Las plántulas se cortaron a 5 cm por debajo del nodo cotiledonar para eliminar las raíces primarias, colocándose 30 secciones de plántulas en recipientes con 30 ml de solución conteniendo 100 μ M CaCl₂, 100 μ M AIA o AIB, 100 μ M α -vanadato de sodio, 100 μ M nitrato de potasio, 10 μ M azida de sodio o 10 μ M Rojo de Rutenio, y las combinaciones respectivas de inhibidor, calcio y auxinas, manteniendo los tratamientos por 24 hrs. Posteriormente se sustituyó esta solución por agua destilada, manteniéndose en obscuridad a 30°C y humedad relativa de 70% durante 5 días. Transcurrido este tiempo, se contó el número de raíces por plántula.

AISLAMIENTO DE FRACCIONES MEMBRANALES ENRIQUECIDAS.

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE TONOPLASTO Y MITOCONDRIA.

100 g de hipocotilos se homogenizaron en 200 ml de medio conteniendo 250 mM sacarosa, 25 mM MES-Tris pH 7.5, 3 mM EDTA, 1 % PVP, 1 mM DTT, 1% BSA y 1 mM Cys, empleando una licuadora a velocidad media durante 8 seg. El homogenizado se filtró a través de 8 capas de gasa y se centrifugó a 3 000 x g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 11 000 x g durante 15 min, recuperándose la pastilla que contenía las mitocondrias que se centrifugó a 10 000 x g durante 10

minutos, mientras que el sobrenadante que contenía membranas de tonoplasto se centrifugó a 126 000 x g durante 1 h, resuspendiendo después la pastilla en 5 ml del medio que contenía 10 mM HEPES- Tris pH 7.2, 1 mM DTT y 10 % sacarosa . La pastilla se purificó centrifugando a 110 000 x g durante 2 h en un gradiente discontinuo de sacarosa (10 ml al 15 %, 10 ml al 33 % y 8 ml al 45 %), colectando la interfase 15/33 % (Allen *et al.*, 1995).

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS

Se homogenizaron 100 g de hipocotilos en licuadora a velocidad media, durante 5 seg en 200 ml de medio conteniendo: 0.3 M sacarosa, 1 mM EGTA, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 0.5 % BSA, durante 8 segundos y se filtró el homogenizado a través de 8 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 13 000 x g durante 15 min, para recuperar el sobrenadante que se centrifugó a 80 000 g durante 30 minutos. La pastilla se centrifugó en gradiente discontinuo de sacarosa 35 y 25 %, a 115 000 x g durante 3 h, recuperando la interfase 35/25 (Packer y Douce, 1987).

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Se homogenizaron 100 g de hipocotilos en licuadora a velocidad intermedia; en 200 ml de medio con 150 mM Tricina pH 7.5, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA y 3 % sacarosa, durante 8 seg y se filtró a través de 8 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 7500 x g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó en gradiente continuo 32, 22 y 15 % de sacarosa en tricina 150 mM, KCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 7.5, a 70 000 x g durante 2 h colectando la fase 22/32 % (Morré *et al.*, 1987).

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ATPasa (hidrólisis de ATP) POR CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO

Las fracciones enriquecidas se almacenaron a -70°C para su posterior evaluación. Se procedió a registrar la actividad de ATPasa en medio de ensayo con 120 mM MES-Tris pH 7.5, 20 mM MgCl_2 , 200 mM KCl, 3 mM ATP, en presencia y ausencia de AIA y AIB 10-100 μM , CaM 10 U. Para mantener el Ca^{2+} libre en el medio se utilizaron soluciones amortiguadoras Ca^{2+} -EGTA. La concentración de EGTA se mantuvo a 1 mM y se realizaron las adiciones del calcio necesarias para alcanzar la concentración deseada, de acuerdo al método de Fabiato, 1998. Se emplearon los siguientes inhibidores: Molibdato de Amonio 0.1 mM (Fosfatasas), Azida de sodio 0.5 mM (ATPasa- H^+ mitocondrial), Vanadato de amonio 0.1 mM (ATPasa- H^+ de Plasmalema), Nitrato de potasio 50 mM (ATPasa de tonoplasto), Eritrosina B 1 μM (ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema) y 15 μM (ATPasa- Ca^{2+} de Retículo) con 80 μg de proteína de cada muestra (Bellamine y Gaspar, 1998). Las mezclas de reacción se incubaron durante 20 min a 30°C , adicionando 0.5 ml de TCA al 30 % para detener la reacción y centrifugando a 18 000 x g durante 2 min para precipitar los restos de membranas. Se recuperó 1 ml del sobrenadante y se adicionó 1 ml de TCA 0.5 N.

Para la determinación de fosfato libre se agregó a la mezcla anterior 1 ml de reactivo de color que se preparó en fresco de la siguiente manera: se disolvieron 2 g de sulfato ferroso en 36 ml de agua destilada y se agregaron 4 ml de molibdato de amonio al 16 % en H_2SO_4 10 N (previamente preparado).

La mezcla anterior se incubó durante 10 minutos exactamente a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 660 nm, elaborando previamente una curva patrón con 10 a 50 μM KH_2PO_4 , (Wharton y McCarty, 1972).

La determinación de proteína se realizó por el método de azul de Comassie, utilizando un patrón de BSA de 10 a 50 μg (Bradford, 1976).

Se realizaron 3 experimentos independientes y cada ensayo se realizó por duplicado, por lo que los resultados son el promedio de 6 determinaciones. La significancia de los resultados se determinó mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación entre medias de Tukey.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa POR HIDRÓLISIS DE ATP CON PIRANINA.

Se emplearon vesículas de membrana plasmática para determinar la actividad de ATPasa con piranina (Clement y Gould, 1981; Rottenberg y Moreno-Sanchez, 1993), para lo cual se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer con una longitud de onda de excitación de 450 y de emisión de 510, intervalo de respuesta de 6 seg. y slit de 10 nm, cada registro se siguió durante 2 minutos, en 2.5 ml de buffer conteniendo 200 mM de sacarosa, 5 mM de MgCl₂, 0.5 mM de MOPS, 0.1 mM de EGTA pH 7.5 (ajustado con Tris), con agua desionizada; 2 mM de ATP, 10 µl de piranina 10 mM, 500 µg de proteína de vesículas con ATPasa-Ca²⁺ de membrana plasmática, 10 µl de NaOH 0.1 N. Se realizaron registros en ausencia y presencia de Ca²⁺ y auxinas.

Los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Exp/cal} \times 700 \times 60 \times \text{tiempo} \times 1 / \text{con.prot.} \times 1 / 0.88 = \text{ATP/min./mg prot.}$$

Donde:

Exp = cm recorridos en 2 min.

cal = cm recorridos al adicionar NaOH

700 = nmoles de protones generados por la adición de 10 µl de NaOH

60 = seg de 1 minuto

tiempo = segundos que dura el trazo

AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE FRIJOL MUNGO.

Desinfectar 30 g de semillas con hipoclorito de sodio al 2 % durante 30 minutos y enjuagar varias veces con agua esterilizada, germinar en cajas de petri con agua destilada, durante 24 horas en obscuridad. Cortar 10 g de radículas de 1 cm de largo aproximadamente, en fracciones de 3 mm en presencia de 10 ml de medio CPW13M modificado que contiene 600 mM manitol, 1 mM de sulfato de magnesio, 1 mM de nitrato de potasio, 200 μ M de fosfato de potasio monobásico, pH 5.8, lavar con 10 ml del medio y plasmolizar durante 30 minutos en 15 ml de medio. Cambiar el medio por solución nueva con 150 mg de Celulasa (1000 U, SIGMA) y 1 ml de Pectinasa (70 U SIGMA), agitar a 40 rpm durante 5 horas a 30 ° C. Filtrar en un tamiz de nylon con una apertura de 70 μ m, enjuagar con 5 ml de medio y centrifugar a 2 500 rpm durante 20 minutos a 10 ° C. Resuspender la pastilla en 8 ml de sacarosa 0.7 M, dividir en dos tubos y agregar a cada uno 4 ml de sacarosa 350 mM/manitol 300mM en Mes-Tris 25 mM pH 6.5, 2 ml de manitol 0.6 M en Mes-tris 25 mM pH 6.5 y centrifugar a 1 500 rpm durante 10 minutos en centrifuga clínica. Colectar los protoplastos en la interfase manitol 0.6 m y manitol/sacarosa, (Evans, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSION

FORMACION DE RAICES CON INHIBIDORES DE ATPasas

Se analizó el efecto de inhibidores de algunas ATPasas y de quelantes o bloqueadores del transporte de calcio sobre la emergencia de raíces adventicias en hipocotilos desprovistos de raíces primarias. La formación de raíces en presencia de calcio con respecto al control se duplicó lo cual confirma la participación del calcio en la formación de raíces adventicias (Nikolayevich *et al*, 1997; Schroeder y Thuleau, 1991)).

El EGTA y el LaCl_3 impiden la incorporación del calcio y ocasionan una disminución en la formación de raíces adventicias con respecto al grupo con calcio. Este efecto sugiere un papel importante del calcio en la inducción del enraizamiento (fig.4). El LaCl_3 ocasionó ausencia total de raíces en la concentración de 2 mM impidiendo la entrada de calcio a la célula. Estos datos coinciden con los reportados por Bellamine y colaboradores en 1998, quienes reportaron una disminución en el porcentaje de enraizamiento a un 20% en ausencia de calcio con EGTA y a un cero por ciento con LaCl_3 .

En todos los experimentos las auxinas promovieron más raíces que los inhibidores de ATPasas empleados por separado. Los tratamientos con auxinas muestran un incremento en el número de raíces del 150% para AIA y del 250% para AIB lo cual confirma la inducción de raíces adventicias por auxinas (Bethke *et al*, 1995; Felle, 1988).

Se observó que el vanadato promovió un aumento en la producción de raíces adventicias con respecto al control aunque este no es fue significativo estadísticamente (Fig. 5), ya que este incremento fue menor que el observado en presencia de auxinas.

Nuestros resultados no indican un efecto del vanadato en la formación de raíces lo que podría deberse a las concentración empleada (100 μM) o al tiempo que duró el tratamiento (24 hrs), sin embargo otros autores sugieren la participación de ATPasas durante la formación de raíces (Muchal *et al*, 1997; Olbe y Sommarin, 1991).

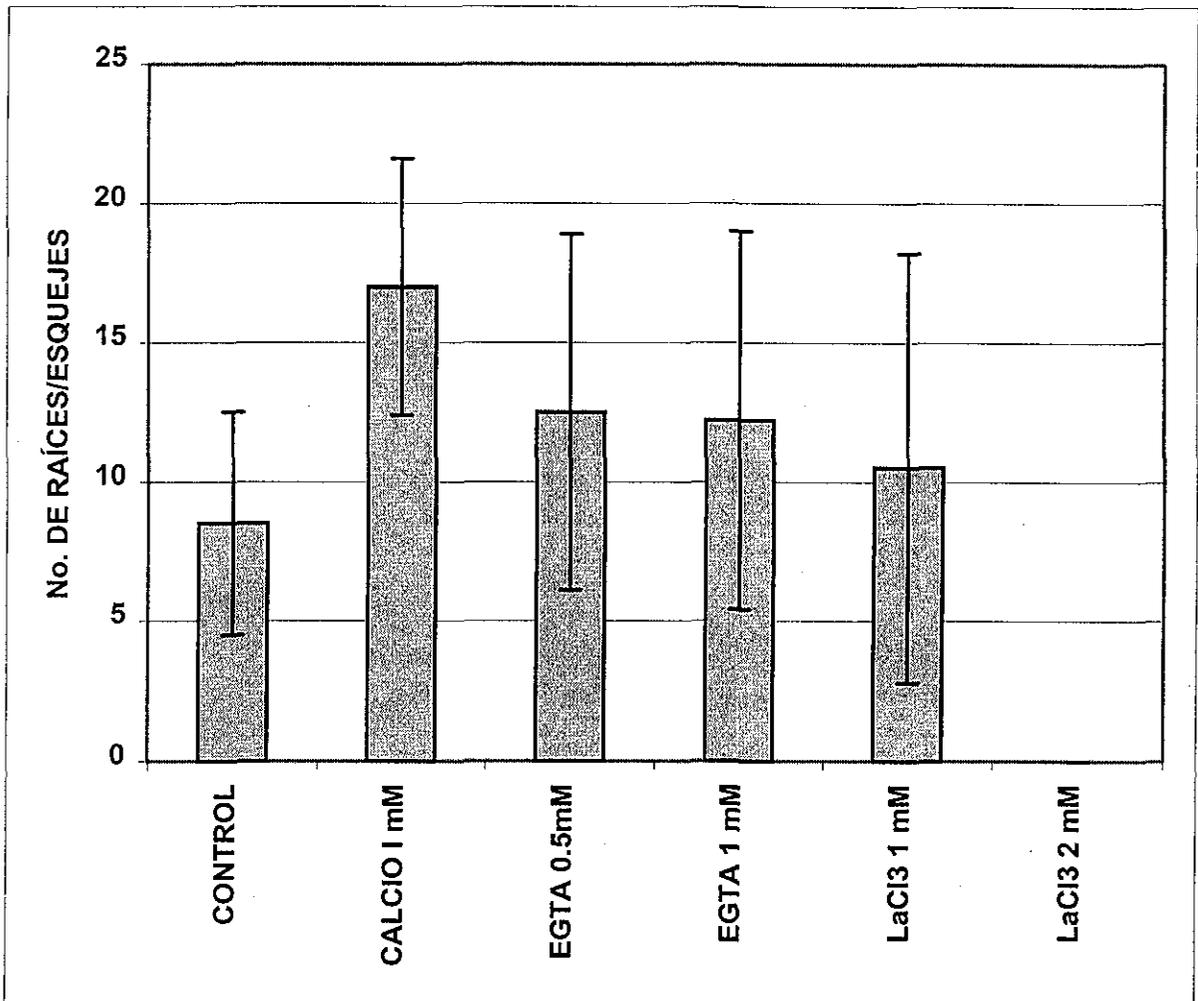


Fig. 4.- Formación de raíces adventicias en presencia de un quelante de calcio y de un bloqueador de canales de calcio. La figura muestra el número de raíces que en promedio se formaron al tratar lotes de 30 plántulas con las sustancias indicadas. Las barras son el promedio de 3 experimentos independientes y la dispersión indica la desviación estandar. **a** indica diferencias significativas con respecto al control mediante una prueba de Tukey.

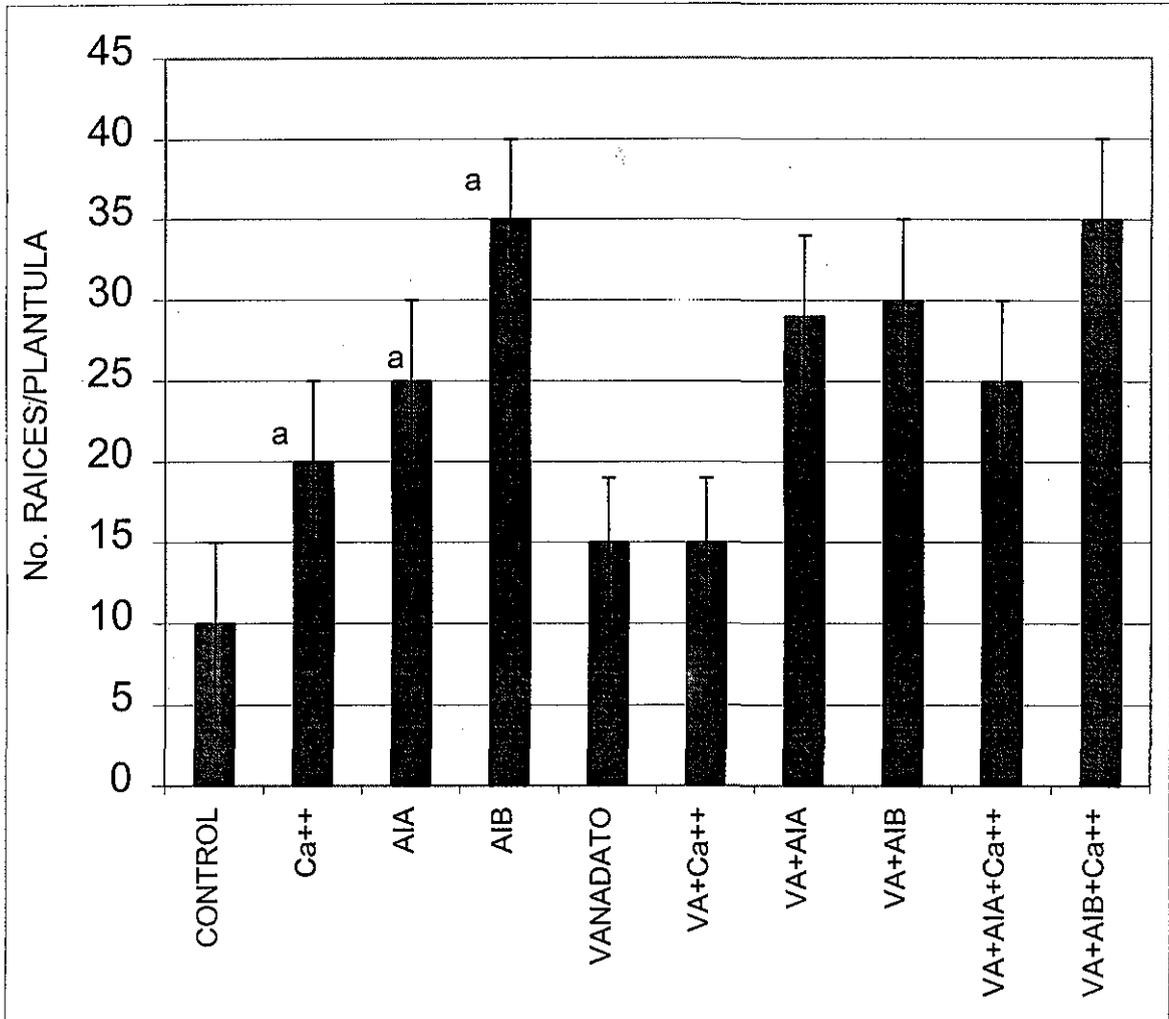


Fig. 5.- Formación de raíces adventicias en presencia de vanadato. La figura muestra el número de raíces que en promedio se formaron al tratar lotes de 30 plántulas con las sustancias indicadas. La concentración final para todas ellas fue de 100 μM . Las barras son el promedio de 3 experimentos independientes y la dispersión indica la desviación estandar. **a** indica diferencias significativas con respecto al control y **b** con respecto al tratamiento con calcio mediante una prueba de Tukey.

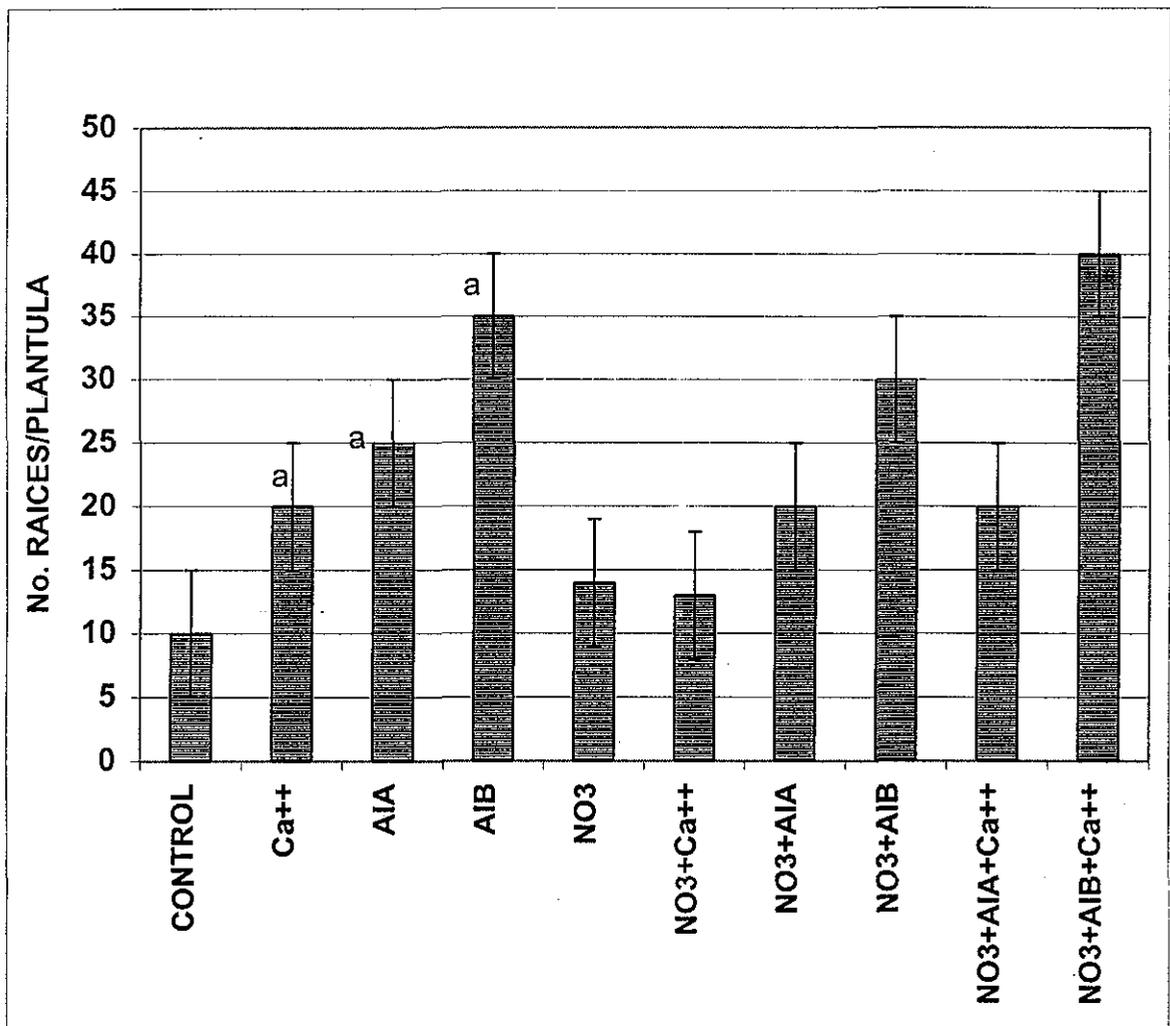


Fig. 6.- Formación de raíces adventicias en presencia de nitrato de potasio. La figura muestra el número de raíces que en promedio se formaron al tratar lotes de 30 plántulas con las sustancias indicadas. La concentración final para todas ellas fue de 100 μ M. Las barras son el promedio de 3 experimentos independientes y la dispersión indica la desviación estandar. **a** indica diferencias significativas con respecto al control mediante una prueba de Tukey.

Bellamine y colaboradores (1998) reportan un 97% de enraizamiento en tallos de alamo para el tratamiento control, un 47% con vanadato 200 μM en presencia de 0.3 mg l^{-1} de ácido naftalenacético durante 7 horas, y un 93% de enraizamiento en un medio con vanadato 200 μM sin auxina, atribuyendo estos resultados a la participación de la ATPasa- H^+ de membrana plasmática.

En la figura 6 se muestra el número de raíces por plántula después de tratarlas con Nitrato de Potasio encontrando diferencias significativas del tratamiento de Nitrato de Potasio solo con respecto al control, con auxinas solas o en combinación con el inhibidor. Sin embargo, debe subrayarse que en condiciones en las que el nitrato se aplicó en combinación con AIB y Ca^{2+} , se obtuvo el mayor número de raíces del experimento, que es coherente con la función de la vacuola como depósito potencial de calcio (Pfeiffer, 1995), por lo que la inhibición de la ATPasa que compartamentaliza calcio en esta célula en este organelo contribuiría a elevar el calcio citosólico. También podrían atribuirse dichos efectos a que el nitrato de potasio estuviera actuando solo como nutriente y esto favoreciera el desarrollo vegetativo. Es claro que el posible aumento de Ca^{2+} en el citosol no sustituye a la actividad de las auxinas, lo que sugiere que las auxinas intervienen activando varios procesos.

La azida de sodio inhibió la promoción de raíces aun en presencia de auxinas (fig. 7). Este efecto puede explicarse si se atiende a que la ATPsintetasa genera ATP para todas las funciones celulares, de manera muy importante se afecta el transporte de iones. por lo que no sólo la rizogénesis sino otros procesos celulares se veían afectados. Lo anterior también explica por qué la mayor parte de los explantes no sobrevivieron.

En la figura 8 se observa que el rojo de Rutenio ocasionó una inhibición de la rizogénesis aún en presencia de auxinas (50% menos con respecto al control) dado que impide el transporte de calcio el rojo de Rutenio pudo modificar la concentración de calcio citosólica.

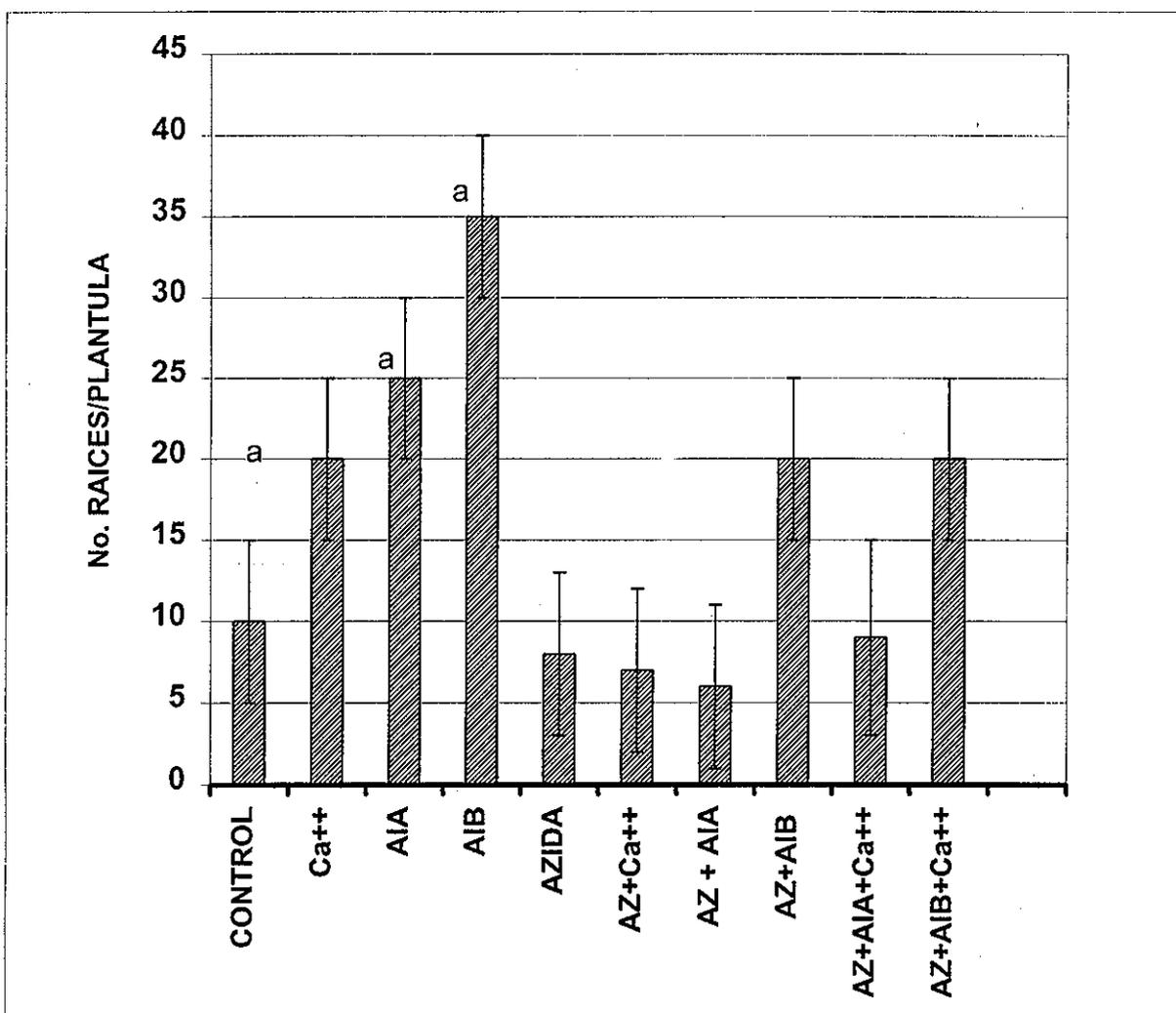


Fig. 7.- Formación de raíces adventicias en presencia de azida de sodio. La figura muestra el número de raíces que en promedio se formaron al tratar lotes de 30 plántulas con las sustancias indicadas. La concentración final de las mismas fue de calcio, AIA y AIB 100 μ M y azida de sodio 10 μ M. Las barras son promedio de 3 experimentos independientes y la dispersión indica la desviación estandar. a indica diferencias significativas con respecto al control mediante una prueba de Tukey.

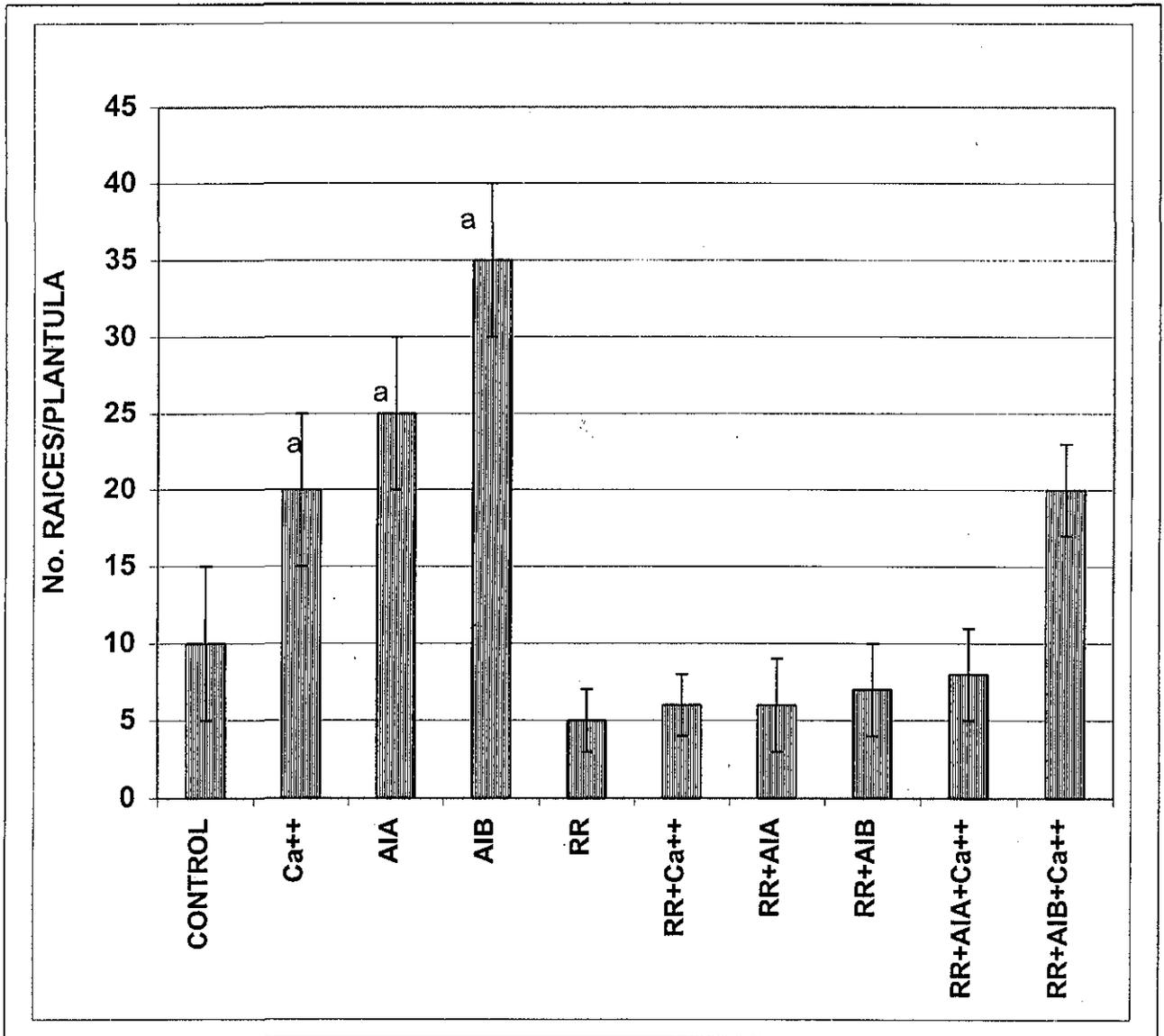


Fig. 8.- Formación de raíces adventicias en presencia de rojo de rutenio. La figura muestra el número de raíces que en promedio se formaron al tratar lotes de 30 plántulas con las sustancias indicadas. La concentración final de las mismas fue de calcio, AIA y AIB 100 μ M y rojo de Rutenio 10 μ M. Las barras son promedio de 3 experimentos independientes y la dispersión indica la desviación estandar. a indica diferencias significativas con respecto al control mediante una prueba de Tukey.

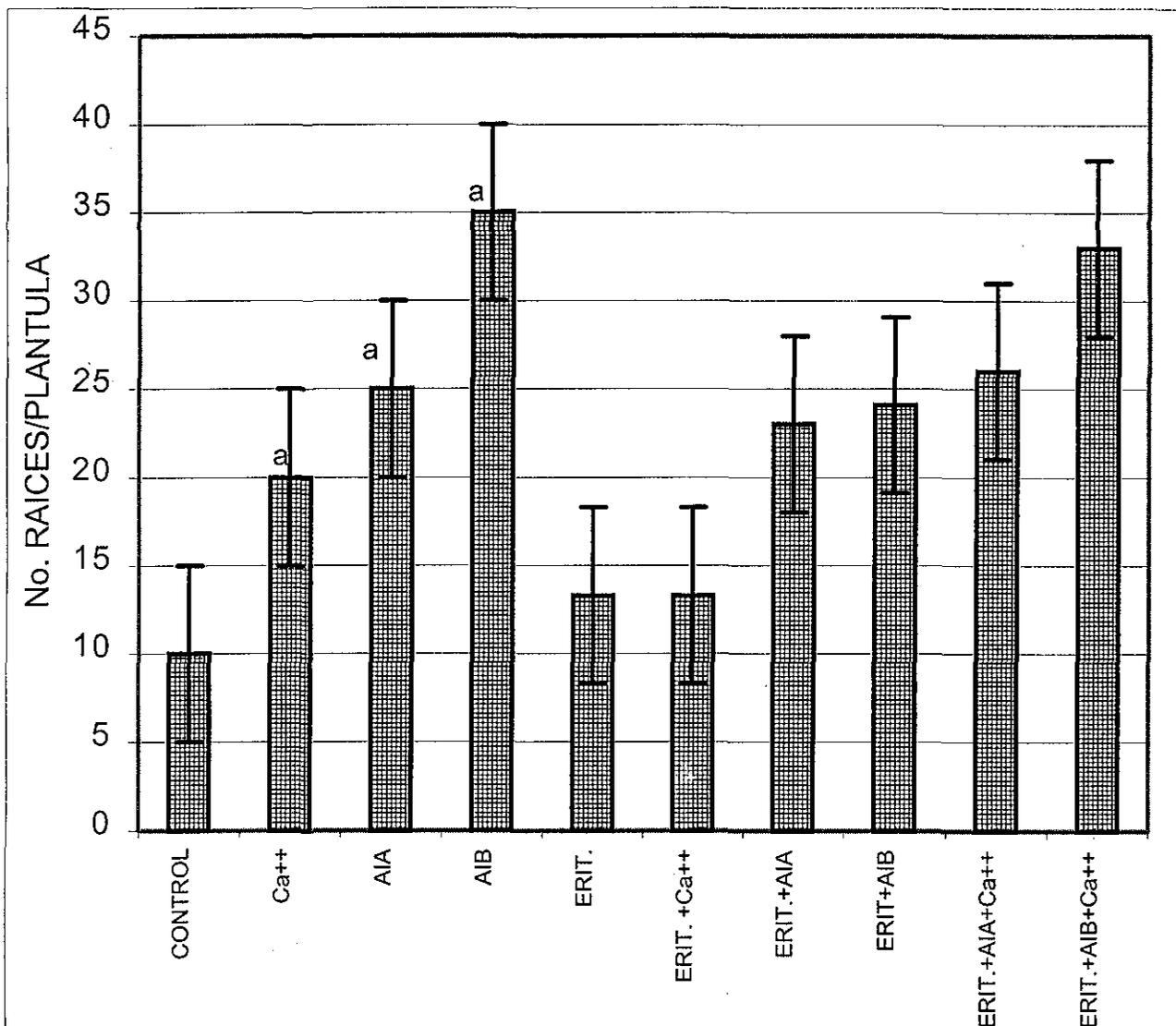


Fig.9.- Formación de raíces adventicias en presencia de Eritrosina B. La figura muestra el número de raíces que en promedio se formaron al tratar lotes de 30 plántulas con las sustancias indicadas. La concentración final de las mismas fue de 100 μM de calcio, AIA y AIB y 10 μM rojo de Rutenio. Las barras son promedio de 3 experimentos independientes y la dispersión indica la desviación estandar. **a** indica diferencias significativas con 99.95% de confianza con respecto al control mediante una prueba de Tukey.

El enraizamiento en presencia de eritrosina B aumentó no significativamente la producción de raíces adventicias (Fig. 9), pero este incremento fue menor que el observado en presencia de auxinas.

Estos resultados no son concluyentes porque no podría asegurarse que los inhibidores llegan al sitio específico en donde deben actuar y en la concentración adecuada, además el conteo de raíces es muy variable por lo que se obtuvieron desviaciones altas, lo cual es común en experimentos similares reportados en la literatura. Sin embargo en el caso de vanadato, nitrato y eritrosina se observa una tendencia a incrementar el número de raíces con respecto al control, lo cual sugiere una posible participación de las ATPasas- Ca^{2+} en la formación de raíces adventicias.

Efecto de las auxinas sobre ATPasas-Ca²⁺ *in vitro*.

Una vez purificada cada fracción se procedió a determinar las condiciones para almacenar las membranas para lo cual se probaron cuatro diferentes temperaturas almacenando las membranas en el buffer de resuspensión respectivo para cada fracción a una concentración de 8 mg/ml, observándose una pérdida total de la actividad a 25 y 4°C ; a -20°C la muestra mantiene solo un 70% de la actividad inicial después de 8 días de almacenada y a -70°C se conserva la actividad inicial por lo menos durante un mes.

Se registró la actividad total con respecto al tiempo entre 0 y 40 minutos para cada fracción, determinándose que la actividad es lineal de 0 a 20 minutos y se mantiene constante hasta los 40 minutos, por lo que se decidió registrar la actividad para el resto de los ensayos a los 20 minutos. Otros autores registraron la actividad entre 10 y 60 minutos (Malin y Sommarin, 1991; Askerlund, 1997; Bellamine y Gaspar, 1998).

La actividad de hidrólisis de ATP de la fracción mitocondrial se midió en presencia de inhibidores de distintas ATPasas encontrando una inhibición de más del 75% con azida de sodio que indica la presencia mayoritaria de ATPsintetasa en esta fracción (tabla 4).

Las mitocondrias aisladas se incubaron con 0.1% de Tritón X-100 durante 5 minutos previos al ensayo, encontrándose un incremento en la actividad de 3 veces.

Se emplearon diferentes concentraciones de AIA y AIB sobre la actividad de ATPasa total en mitocondria, entre 20 y 100 µM. La concentración 100 µM fue la más efectiva, por lo que esta fue utilizada en los siguientes ensayos.

[I]	mM	% de Actividad + DS
Total		100 ± 4
Azida	0.5	23 ± 2
KNO ₃	50	94 ± 5
Molibdato	0.1	91 ± 7
VO ₄ Na ₃	0.1	92 ± 6

Tabla 4. Efecto de varios inhibidores en la hidrólisis por la la ATPsintetasa de la fracción mitocondrial. La actividad se registró incubando membranas mitocondriales a 30° C, durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP a pH 7.4. La actividad total equivale a 108 nmolPi min⁻¹ mg⁻¹ prot. Los datos son el promedio de 6 repeticiones a partir de 3 aislamientos de lotes independientes, cada determinación se realizó por duplicado ± DS.

Al incubar membranas mitocondriales en presencia de auxinas se observó que el ácido indol acético incrementó un 18% la actividad de hidrólisis de la ATPsintetasa con respecto al control. El AIA en presencia de calcio inhibió un 20% con respecto a la actividad en presencia de solamente calcio y no tuvo efecto significativo con respecto al control. El AIB ocasionó un incremento del 40% con respecto al control y en combinación con calcio no tuvo efecto. Estos resultados muestran efectos distintos de las 2 auxinas siendo el AIB la auxina con un efecto mayor (Fig. 10).

Si bien no existen reportes del efecto de auxinas sobre esta ATPasa, otros resultados de nuestro laboratorio sugieren que las auxinas actúan como desacoplantes sobre mitocondrias intactas y coinciden con reportes como el de Nanda (1976), en el que se muestra que los desacoplantes promueven la producción de raíces. La promoción de la actividad de hidrólisis de la ATPasa-H⁺ por parte de las auxinas en las membranas mitocondriales sugiere una disminución en los niveles de ATP, que aunado a la acción desacoplante restringiría el bombeo de Ca²⁺ dependiente de este nucleótido.

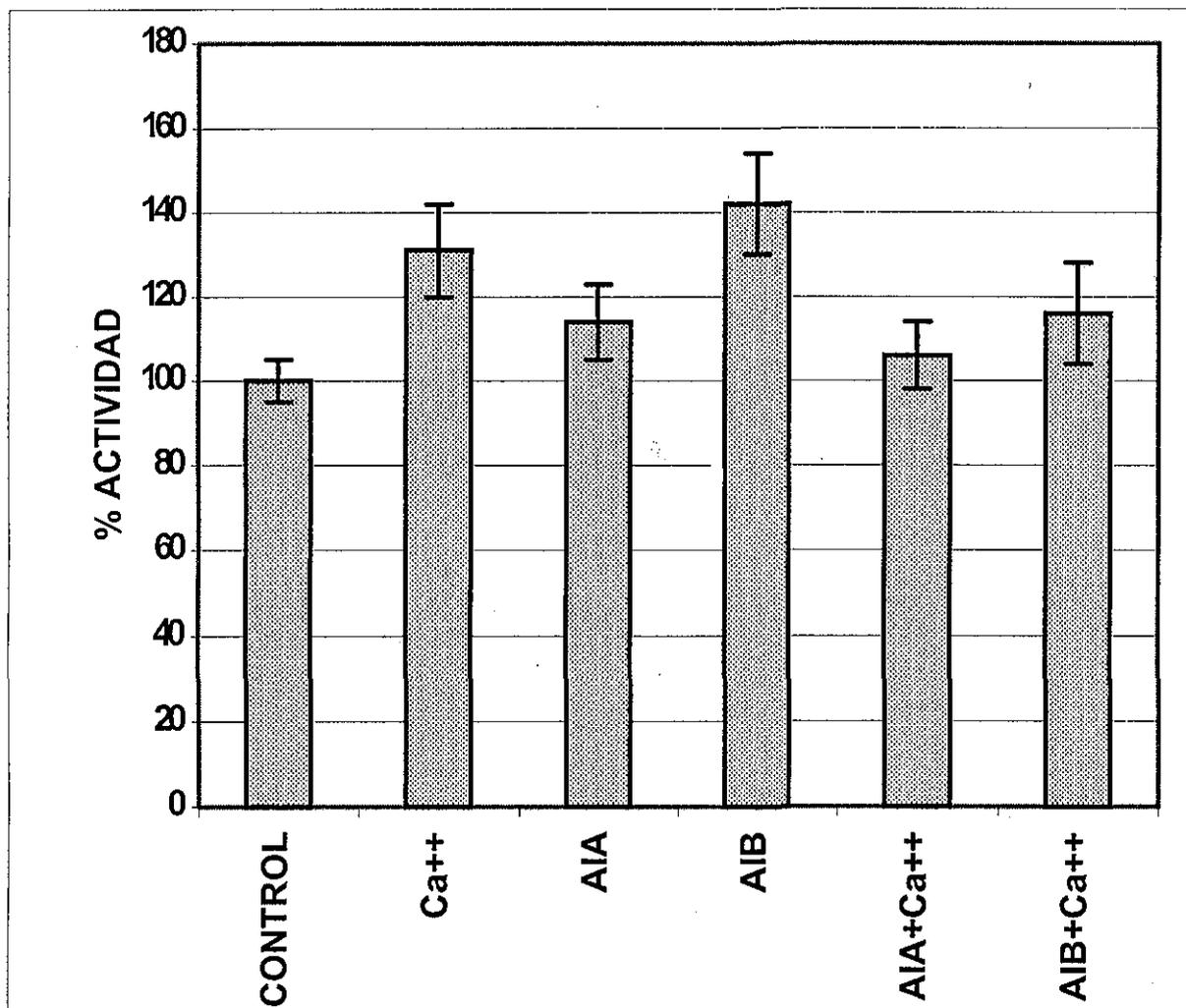


Fig. 10. Efecto de auxinas sobre la ATP sintetasa. Las mitocondrias se incubaron con 0.1% de Triton X-100 durante 5 minutos previamente. La actividad se registró incubando membranas mitocondriales a 30° C, durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP, Ca²⁺, AIA y AIB 100 μM, vanadato de sodio 0.1 mM, nitrato de potasio 50 mM y eritrosina B 50 μM a pH 7.4. El control equivale a una actividad específica de 110 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ prot. Los datos son el promedio de 6 repeticiones a partir de 3 aislamientos de lotes independientes, cada determinación se realizó por duplicado ± DS.

ATPasa-Ca²⁺ DE PLASMALEMA

La técnica empleada para la purificación de membrana plasmática en gradiente de sacarosa, produjo un rendimiento del 59% (Tabla 5), superando a la técnica de partición de fases en donde se obtienen rendimientos del 35 al 55 % (Evans, *et al*, 1992).

[I]	mM	% de Actividad + DS
Total		100 ± 6
Azida	1	91 ± 3
Dietilbestrol	0.1	34 ± 9
Eritrosina B	0.002	59 ± 11
KNO ₃	50	89 ± 5
Molibdato	0.1	95 ± 7
VO ₄ Na ₃	0.1	27 ± 14

Tabla 5. Efecto de varios inhibidores en la actividad de ATPasa de Plasmalema. La actividad se registró incubando membranas plasmáticas a 30° C, durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP a pH 7.4. La actividad total equivale a 230 nmolPi min⁻¹ mg⁻¹ prot. Los datos son el promedio de 6 repeticiones a partir de 3 aislamientos de lotes independientes, cada determinación se realizó por duplicado ± DS.

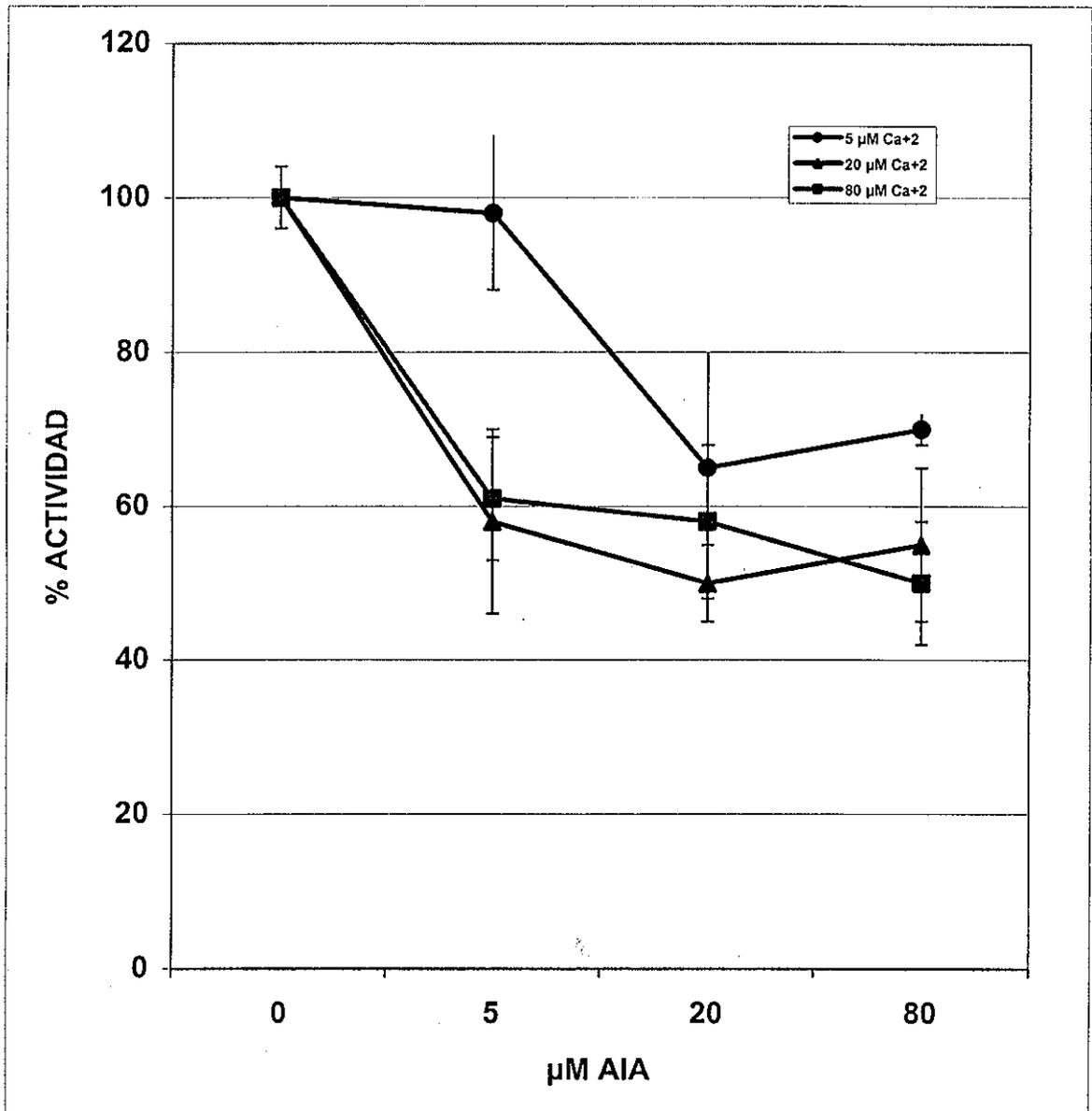


Fig. 11. Efecto de auxinas sobre la ATPasa-Ca²⁺ de plasmalema. La actividad se registró en presencia de ITP 3 mM, Dietilbestrol, nitrato de potasio 50 µM, azida de sodio 1 mM a pH 7.5, en presencia de calmodulina. La actividad total equivale a 147 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ prot. Los datos son promedio de 6 repeticiones a partir de 3 aislamientos de lotes independientes, cada determinación se realizó por duplicado ± DS.

Al incubar membranas de plasmalema en presencia de calmodulina (0.25U), se observó que en todos los casos se presentó un aumento de 5 a 15% en la actividad, Evans *et al.* (1991, 1992 y 1994); Kurosaki (1997) y Askerlun (1997). También reportaron una activación por calmodulina de un 25 a un 95%. La menor activación que registramos podría deberse a que el ensayo se registró a pH 7.5 que es el óptimo para la ATPasa de Ca^{2+} y en los reportes antes citados se evaluó a pH de 6.9 que es el óptimo para la calmodulina. Las diferencias podrían deberse también a las concentraciones de calmodulina empleadas.

Otros autores sugieren la presencia en plantas de una ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema que no se estimula con calmodulina y que la ATPasa- Ca^{2+} que responde a calmodulina se encuentra en el retículo endoplásmico (Rasi-Caldongo *et al.*, 1995). Sin embargo la mayoría coincide en que la ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema es estimulada por calmodulina.

Evans *et al.* (1992) reportan que el tritón promueve la disociación de la calmodulina endógena unida a la membrana, en este trabajo se adicionó el detergente para asegurar que la estimulación provocada por la adición de calmodulina exógena fuera la m no se observó incremento en la actividad al aplicarlo al 0.1%, lo que indica que no había calmodulina endógena unida a la ATPasa, ya que además se observó estimulación por calmodulina exógena.

La ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema se inhibió un 40% con 5 μM de AIA (Fig. 11). Este efecto adquiere particular relevancia, bajo el supuesto de que inhibiéndose la expulsión del calcio por parte de esta ATPasa, se estaría favoreciendo la elevación de este importante ión en el citosol, permitiendo así la activación de un conjunto de sistemas que condujeran hacia la formación de raíces adventicias.

Durante la transducción de señales las ATPasas- Ca^{2+} participan en la restauración primaria de la concentración de calcio citosólico, pero dada la dificultad de medir la actividad de ATPasas en células vivas, las evidencias para demostrar como son reguladas *in vivo* son escasas. El rápido decremento en la concentración de calcio citosólico inducido por ABA en protoplastos de aleurona puede ser atribuido a la activación de la ATPasa- Ca^{2+} , pero el mecanismo de esta activación es desconocido (Wang *et al.*, 1991).

La aplicación de auxinas a coleoptilos de maíz ocasiona un incremento en el calcio citosólico pero se desconoce el mecanismo que provoca este incremento (Telle, 1988; Gehring *et al.*, 1990; Zochi y Raboti, 1993).

ATPasa- Ca^{2+} DE TONOPLASTO

Se obtuvo un rendimiento de 67% de la actividad de ATPasa registrada para esta fracción. Se registró la actividad de ATPasa de membranas de tonoplasto y retículo endoplásmico en presencia de distintas concentraciones de calcio para observar el comportamiento de esta ATPasa, encontrando una máxima actividad con 5 μM de calcio (Fig. 12), por lo que se empleó esta concentración en los siguientes experimentos.

[I]	mM	% de Actividad + DS
Total		100 ± 7
Azida	1	92 ± 6
Dietilbestrol	0.1	91 ± 6
Eritrosina B	0.002	82 ± 11
KNO ₃	0.05	33 ± 9
Molibdato	0.1	96 ± 7
VO ₄ Na ₃	0.1	89 ± 11

Tabla 6. Efecto de varios inhibidores en la actividad de ATPasa de tonoplasto. La actividad se registró incubando membranas de vacuola a 30° C, durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP a pH 7.4. La actividad total equivale a 75 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ prot. Los datos son promedio el de 6 repeticiones ± DS a partir de 3 aislamientos de lotes independientes, cada determinación se realizó por duplicado

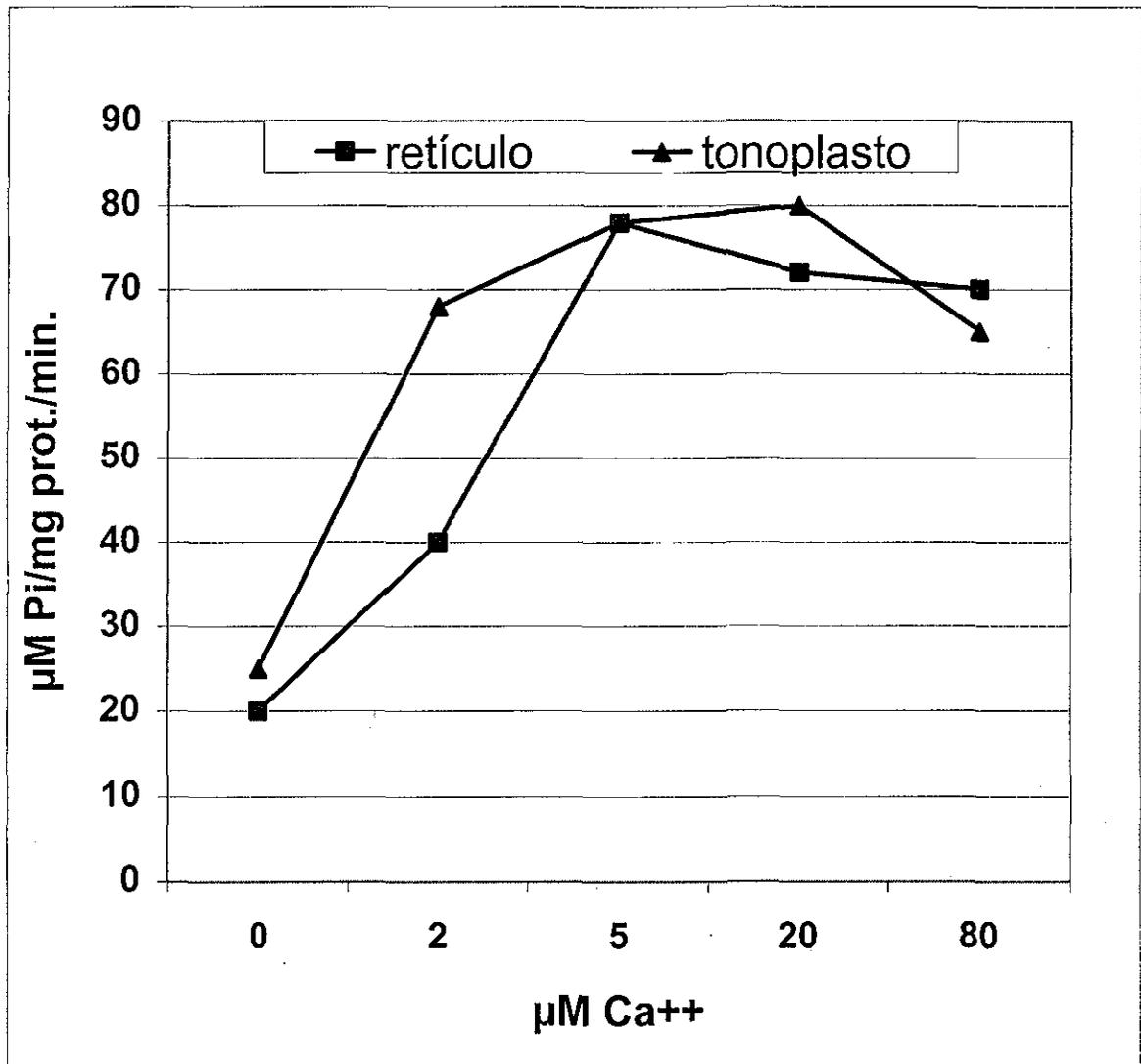


Fig. 12.- Efecto de la concentración de calcio sobre la ATPasa-Ca⁺⁺ de plasmalema y tonoplasto. La actividad se registró incubando membranas en buffer con 0.1 mM de EGTA a pH 7.4 en presencia de 3 mM de ATP a 30° C, durante 20 minutos. Los datos son el promedio de 3 repeticiones a partir de lotes independientes.

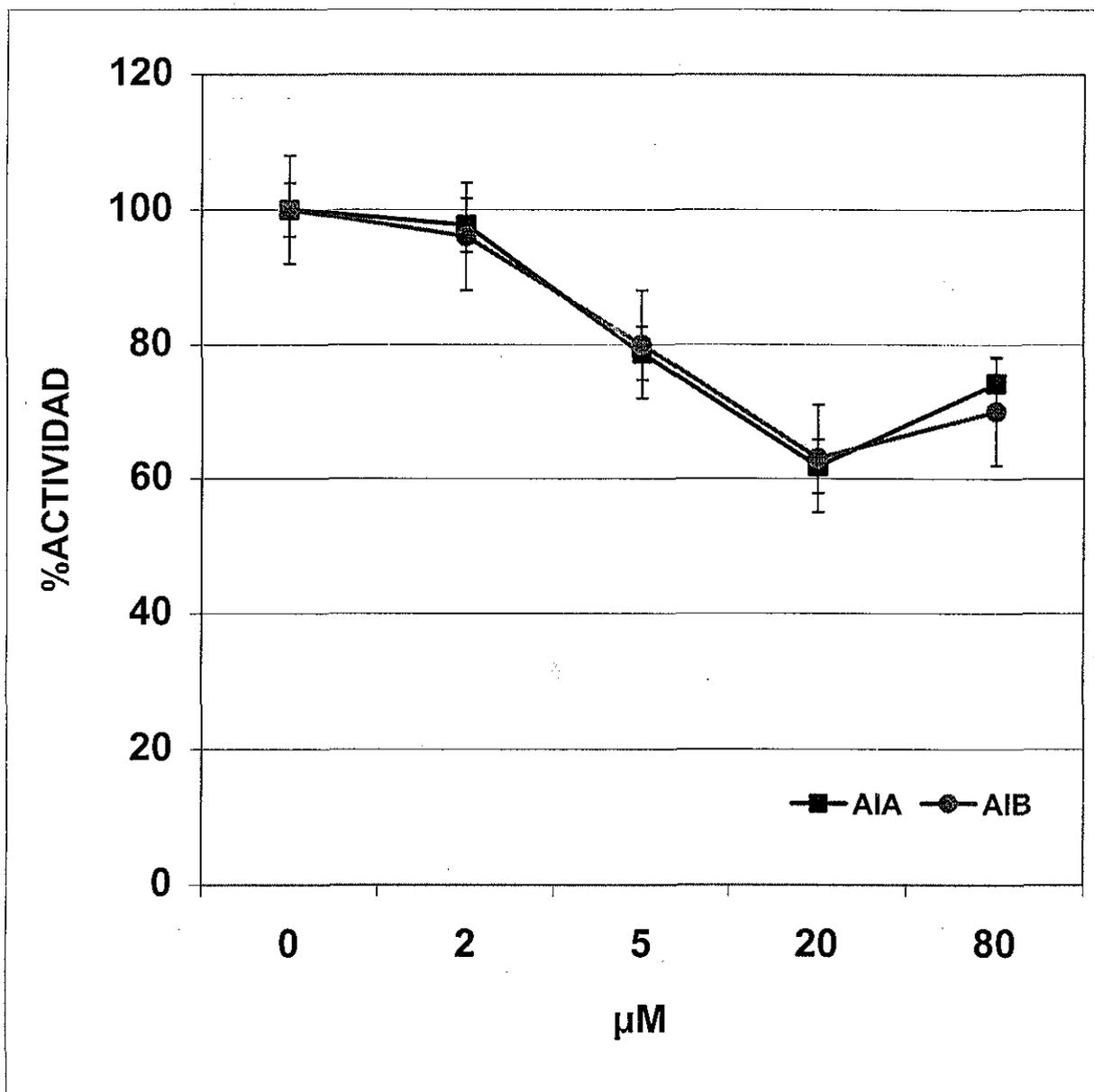


Fig. 13.- Actividad de ATPasa- Ca^{2+} de tonoplasto. La actividad se registró incubando membranas a 30°C , durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP, Ca^{2+} , AIA y AIB $100 \mu\text{M}$, dietilbestrol $100 \mu\text{M}$, eritrosina B $50 \mu\text{M}$, azida de sodio 1 mM. El control equivale a una actividad específica de $111 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$. Los datos son el promedio de 6 repeticiones de lotes independientes $\pm \text{DS}$, cada determinación se realizó por duplicado.

El efecto de las dos auxinas sobre la ATPasa-Ca²⁺ de tonoplasto fue semejante, se observó una inhibición del 36 % con 20 µM de AIA y AIB. Si se considera que la vacuola puede ser un reservorio importante de calcio, al interrumpir la compartimentalización del calcio en la vacuola se contribuiría a incrementar el calcio citosólico.

Esta ATPasa ha sido caracterizada recientemente (Allen, 1995), por lo que no existen trabajos acerca de su posible participación en la rizogénesis ni en señales hormonales.

ATPasa- Ca²⁺ DE RETÍCULO ENDOPLASMICO

La fracción obtenida de retículo endoplásmico registró una actividad de ATPasa-Ca⁺⁺ de 70 %

En la figura 14 se observa que 20 µM de AIA provocaron una inhibición del 35 %, y esa misma inhibición se alcanzó con 5 µM de AIB. La participación del retículo endoplásmico como reservorio de calcio está bien documentado en células animales, en plantas este organelo parece tener funciones parecidas por lo que la modulación del transporte de calcio debe estar determinada por distintos estímulos como podrían ser las auxinas.

[I]	mM	% de Actividad + DS
Total		100 + 6
Azida	1	90+ 7
Dietilbestrol	0.1	96 + 8
Eritrosina B	0.02	29 + 4
KNO ₃	0.05	89 + 2
Molibdato	0.1	97 + 5
VO ₄ Na ₃	0.1	60 + 11

Tabla 7. Efecto de varios inhibidores en la actividad de ATPasa de Retículo endoplásmico. La actividad se registró incubando membranas de retículo endoplásmico a 30° C durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP a pH 6.8. La actividad total equivale a 196 nmolPi min⁻¹ mg⁻¹ prot. Los datos son el promedio de 6 repeticiones a partir de 3 aislamientos de lotes independientes ± DS, cada determinación se realizó por duplicado.

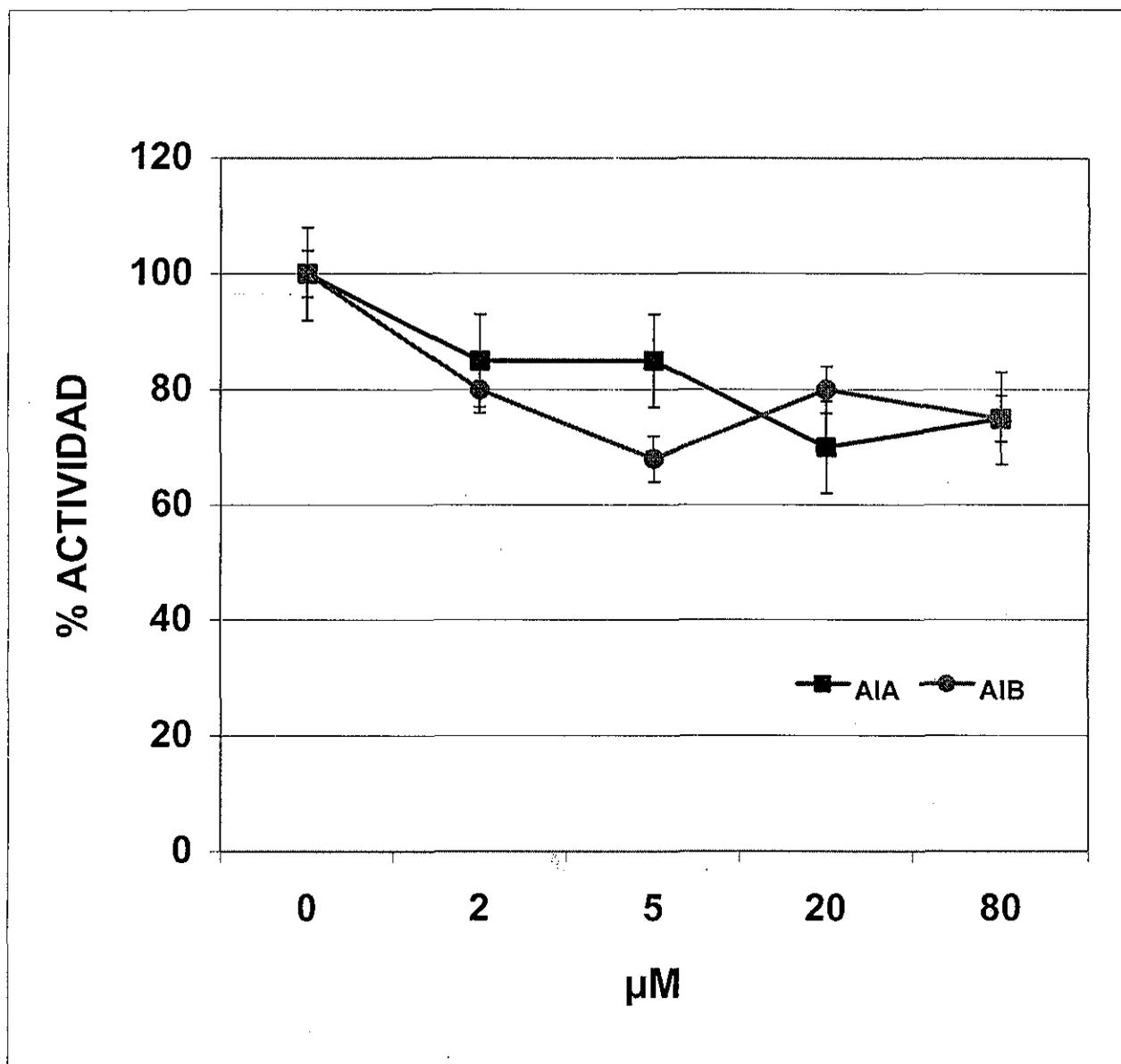


Fig. 14.- Actividad de ATPasa- Ca^{2+} de retículo endoplásmico. La actividad se registró incubando membranas a 30°C , durante 20 minutos en presencia de 3 mM de ATP, Ca^{2+} , AIA y AIB 100 μM , dietilbestrol 100 μM , nitrato de potasio 100 μM , eritrosina B 1 μM , azida de sodio 1 mM. El control equivale a una actividad específica de 248 $\text{nmol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$. Los datos son el promedio de 6 repeticiones a partir de 3 aislamientos de lotes independientes \pm DS, cada determinación se realizó por duplicado.

Para corroborar los datos obtenidos se registró la actividad de la ATPasas- Ca^{2+} de plasmalema utilizando la técnica de hidrólisis de ATP con piranina (fig. 15) mediante un espectrofluorómetro PerkinElmer modelo LS50B. Los datos obtenidos con esta técnica muestran una inhibición del 33% con AIA y de 31 % con AIB de la ATPasa- Ca^{2+} Ca^{++} de plasmalema (fig. 16), aunque son valores menores, la inhibición de ATPasa- Ca^{++} coincide con la registrada por cuantificación de fosfato.

Numerosos reportes involucran la modulación de la concentración de calcio como respuesta a distintos estímulos como la luz, hormonas, depredadores, hipoxia, salinidad, etc. (Evans y Williams, 1998; Zochi y Raboti, 1993).

Los resultados de este trabajo muestran una inhibición de las ATPasas- Ca^{2+} por ambas auxinas *in vitro* y que coinciden con el efecto de inhibidores de estas ATPasas en la formación de raíces adventicias, aunque se observó una diferente respuesta de las ATPasas- Ca^{2+} de distintos compartimentos celulares, lo cual coincide con otras evidencias que indican diferencias funcionales entre la ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema y las de endomembranas (Geisler *et al.*, 2000).

La inhibición de las ATPasas- Ca^{2+} por auxinas es mayor con AIB que con AIA lo cual podría explicar la mayor inducción de raíces con AIB que algunos autores atribuyen a su mayor estabilidad, a que no existe una maquinaria enzimática para su degradación o a que las formas activas de estas auxinas sean derivados metabólicos y que se generan productos diferentes a partir de cada auxina (Riov y Epstein, 1988; Peñalosa, 1998).

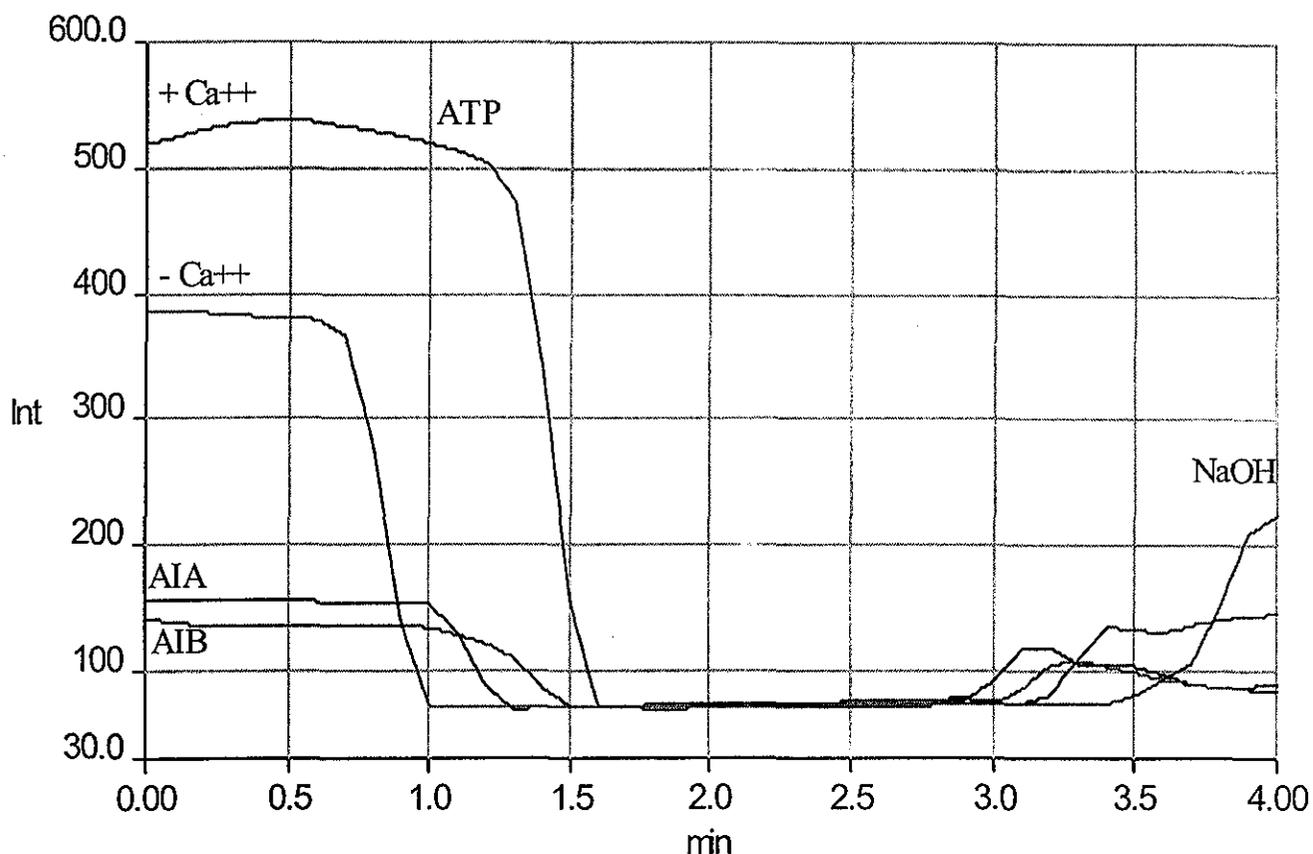


Fig. 15. Hidrólisis de ATP con piranina. El registro se realizó en un espectrofluorómetro PerkinElmer modelo LS50B empleando una longitud de onda de excitación de 450 nm de emisión de 507 nm con 2.5 ml de buffer conteniendo 200 mM de sacarosa, 5 mm $MgCl_2$, 0.5 mM MOPS, 0.1 mM EGTA pH 7.5. Se emplearon 500 μg de proteína de plasmalema. Durante el registro se realizaron las adiciones que se indican el gráfico, Piranina 10 mM, ATP 2 mM, $CaCl_2$ 10 mM, AIA 10 mM. Se realizaron los controles sin auxina y con inhibidores de ATPasas por duplicado de lotes independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

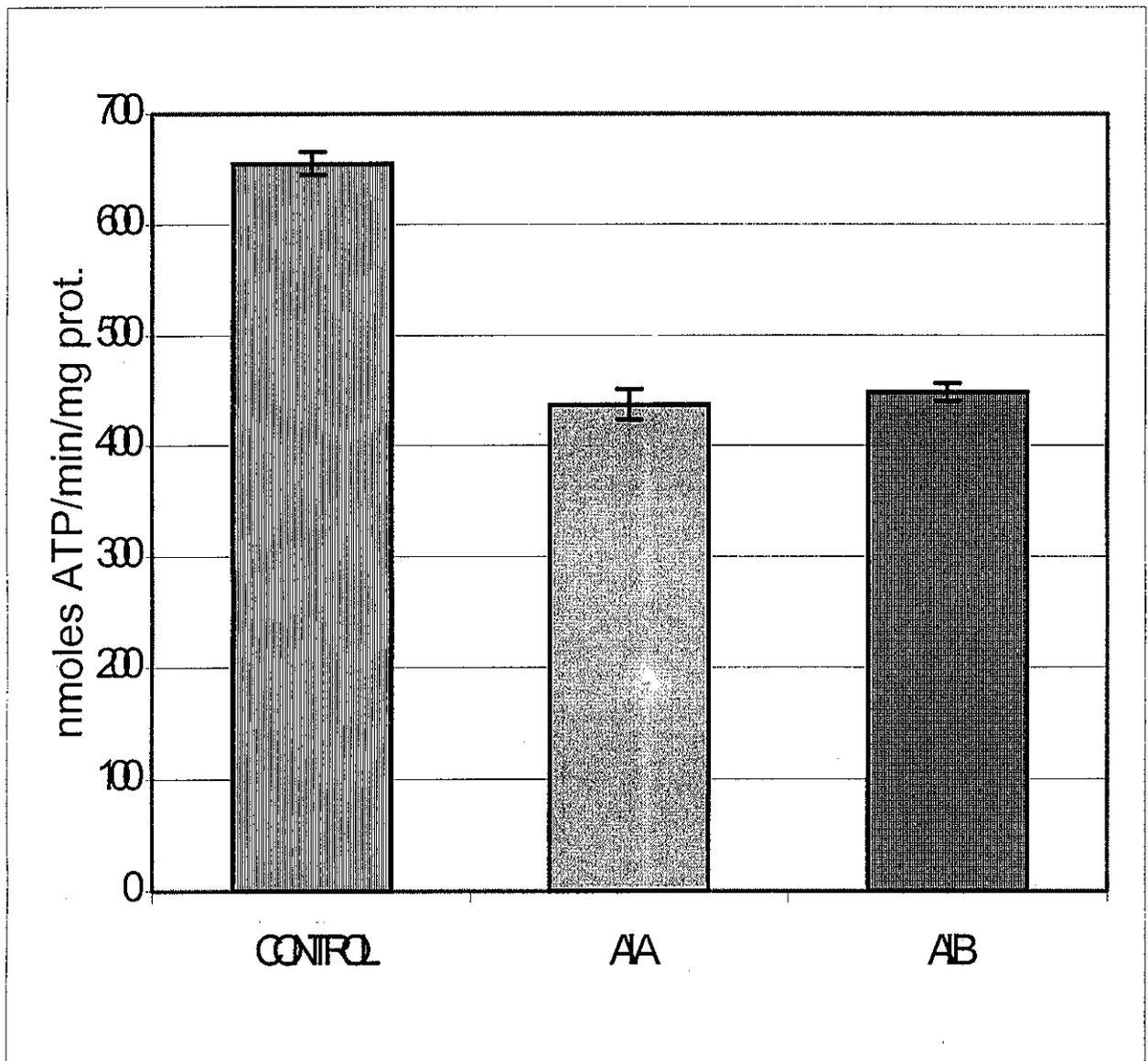


Fig. 16 Actividad de ATPasa- Ca^{2+} de plasmalema mediante hidrólisis de ATP con Piranina. En la grafica se muestra el promedio \pm D.S. de 4 registros de dos lotes de plantulas independientes, a partir del registro de la figura 15.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El mecanismo de esta inhibición se desconoce, pero se sabe que algunas ATPasas- Ca^{2+} son inhibidas por una subunidad que funciona como autoinhibidor y otras por una proteína separada de la ATPasa; cuando cualquiera de ellas son removidas se incrementa la afinidad por el calcio y la V_{max} . La inhibición se debe generalmente a un bloqueo estérico que impide el acceso del sustrato al sitio activo o indirectamente por una conformación inactiva de la enzima, cuyo mecanismo se desconoce (Geisler, M. *et al.*, 2000), por lo que habrá que investigarse cual de estos mecanismos o algún otro determina la inhibición de auxinas y si el AIB actúa de forma diferente al AIA.

La regulación también puede depender de reacciones de fosforilación que ocasionan la disociación de la bomba mediadas por cinasas reguladas por calmodulina y del ambiente lipídico que rodea las ATPasas, como ocurre en animales (Evans y Williams, 1998), es decir en cambios en algunos lípidos asociados a las ATPasas que favorezcan arreglos conformacionales específicos. Se ha reportado que las auxinas modifican la fluidez de la membrana (Naiper, 1995).

Se ha observado la modificación de ATPasas- Ca^{2+} por hormonas vegetales pero se desconoce si existe una interacción directa o es reflejo de eventos indirectos (Geisler, M. *et al.*, 2000) como los mencionados anteriormente.

La cuantificación de calcio en células vegetales se complica por la presencia de la pared celular que acumula grandes cantidades de este ión, algunos autores han empleado microelectrodos pero esto ha sido posible en células de dimensiones considerables que permiten la manipulación (Terry *et al.*, 1992). Otros autores determinaron el transporte de calcio utilizando calcio radioactivo (Zochi y Raboti, 1993).

Con la intención de confirmar si la inhibición de las ATPasas- Ca^{2+} por auxinas provocaba un incremento en la concentración de calcio citosólico se montó un experimento con protoplastos aislados de radículas de frijol mungo para determinar la concentración de calcio citosólico en presencia de inhibidores de ATPasas- Ca^{2+} empleando Fura-2 mediante un espectrofluorómetro y por microscopia de fluorescencia.

Estos experimentos no arrojaron resultados confiables debido a dos problemas: primero la incorporación del fluoróforo no era eficiente o no se encontraba en su forma activa y el segundo era la fragilidad de los protoplastos en un medio libre de calcio, que se lisaban en poco tiempo, lo que imposibilitó la determinación.

El empleo de isótopos radioactivos podría ayudar a establecer si se acumula calcio en el citosol y en combinación con liposomas que incluyan ATPasas- Ca^{2+} podría esclarecerse como inhiben las auxinas a estas enzimas, para contribuir con el entendimiento del mecanismo de acción de las auxinas en la promoción de raíces adventicias.

Algunos reportes indican un cambio en el potencial de membrana o la apertura de canales de calcio en presencia de auxinas (Johannes et al, 1992), que explicarían un incremento en la concentración citosólica, pero dado que la célula tiene bombas en distintos compartimentos celulares que utilizan energía para mantener bajos niveles de calcio citosólico, la entrada abrupta de este ión ocasionaría una estimulación de las ATPasas- Ca^{2+} para mantener la homeostasis de calcio en la célula por lo que si las auxinas también disminuyen su actividad, ya que debe haber diferentes receptores para la misma señal, que generen una respuesta más compleja (Allan y Trewabas, 1994), se alcanzaría rápidamente la concentración umbral de calcio necesario para desencadenar una respuesta fisiológica como sería la formación de raíces adventicias.

CONCLUSIONES

Los tratamientos de enraizamiento en presencia de inhibidores de ATPasas, quelantes y bloqueadores de canales de calcio, indican la participación de este ión en el mecanismo de formación de raíces adventicias. No se observó un efecto significativo en presencia de inhibidores de ATPasas, sin embargo el vanadato y la eritrosina B incrementaron el número de raíces con respecto al control, lo cual coincide con los resultados de los experimentos *in vitro*.

Las auxinas ácido indol-3-acético y ácido indol-3-butírico, no mostraron efecto significativo sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-H⁺ mitocondrial.

El ácido indol-3-acético y ácido indol-3-butírico inhibieron en un 50 % la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ de plasmalema, un 40 % la ATPasa-Ca²⁺ de tonoplasto y un 30 % la ATPasa-Ca²⁺ de retículo endoplásmico.

La inhibición de las ATPasas-Ca²⁺ de plasmalema, retículo y tonoplasto podría significar una disminución en la expulsión de calcio al espacio extracelular, así como un retardo en la compartimentalización en vacuola y retículo endoplásmico que son los principales reservorios de calcio en la célula.

PERSPECTIVAS

Para elevar los niveles de calcio citosólico rápidamente, tendrán que activarse canales presentes en la membrana plasmática para permitir la incorporación de calcio a la célula, pero junto con este evento tendría que detenerse su expulsión o compartimentalización en organelos ya que la expulsión por ATPasas retardaría alcanzar la concentración de calcio necesaria para desencadenar la respuesta de formación de raíces además de emplear energía.

El mecanismo de formación de raíces adventicias involucra distintos eventos por lo que no es sencillo discriminar la participación de cada componente. Distintas evidencias indican la participación del calcio en este proceso, por lo que es indispensable indagar como el calcio eleva su concentración citosólica, para completar los resultados de este trabajo es necesario cuantificar el calcio citosólico en presencia y ausencia de inhibidores del transporte de calcio (canales y ATPasas), empleando isotopos radioactivos y/o por microscopia confocal.

Dado la participación de las cinasas en distintos eventos de regulación enzimática y sabiendo que varias cinasas son dependientes de calcio y que están asociadas a ATPasas en la membrana plasmática, sería importante analizar la posible participación de estas enzimas en el enraizamiento.

Si se purifican las ATPasa-Ca²⁺ de plasmalema, tonoplasto y retículo endoplásmico así como los canales de calcio de plasmalema y se incorporan por separado en liposomas podría estudiarse el efecto de las auxinas en cada uno de los transportadores de calcio y su interacción con otras moléculas como calmodulina, cinasas, ATPasa-H⁺, entre otras.

Entender el mecanismo de formación de raíces *per se* es importante y posibilitaría el emplear esta información para aplicarla en cultivos que se propagan empleando reproducción vegetativa, como es el caso de muchos frutales y ornamentales.

Otros resultados de nuestro equipo indican que el impedimento de muchas especies para formar raíces adventicias está relacionado con la elevada actividad de indolacético oxidasa, una enzima que degrada la hormona endógena y que incrementa su actividad cuando se aplica hormona exógena, por lo que se ha sintetizado un derivado del AIA que no es reconocido por la hormona, para emplearlo con fines de propagación vegetativa, por lo que es importante evaluar la participación del calcio y las ATPasas- Ca^{2+} con este derivado.

REFERENCIAS

1. Alexandre, J.; Lassalles, J. P. y Kado, R.T. 1990. Opening of Ca^{+2} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature* 343: 567-570.
2. 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.
3. Allen, G. J.; Morais, F.; Muir, S.; Wyn Jones R. G.; Leigh, R.A. 1995. Characterisation of a Ca^{+2} dependent ATP hydrolysis associated with the vacuolar membrane of wheat roots. *Physiol. Plant.* 94:506-514.
4. Aloni, R. 1987. Differentiation of vascular tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:179-204.
5. Askerlund, P. 1996. Modulation of an intracellular calmodulin-stimulated Ca^{2+} -pumping ATPase in Cauliflower by tripsin. *Plant Physiol.* 110:913-922.
6. 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.
7. Bethke, P. C.; Gilroy, S. Y Jones, R. 1995. Calcium and Plant Hormone Actino. Davies, P. ed. *Plant Hormones*. 2° ed. Kluwer Academic Publisher. USA. 298-317 pp.
8. Brosnan, J.M. y Sanders, D. 1990. Inositol triphosphate-mediated calcium release in beet microsomes is inhibited by heprin. *FEBS Lett.* 260:70-72.
9. 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.
10. Bush, D. S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:95-122.
11. Caldongo-Rasi. 1993. Regulation of the Plasma Membrane Ca^{+2} Pump of Higher Plants. *Plant Physiol.* 103:385-390.

12. Carnelli, A.; De Michellis, M.; Rasi-Caldongo, F. 1992. Plasma Membrane ca-ATPase of radish seedlings. I Biochemical characterization using ITP as a substrate. *Plant Physiol.* 98:1196-1201.
13. Caruso, J. L. 1987. The auxin conjugates. *Hort-Sci* 22:1201-1207.
14. Clement, N.R. and Gould, M. 1981. Pyranine as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 20: 1534-1538.
15. Cohen, J. D. and R.S. Bandurski. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Ann. Rev.Plant Physiol.* 33:403-454.
16. Cohen, J. D. and Lilly, 1984. Changes in ⁴⁵Calcium concentration following auxin treatment of protoplasts isolated from etiolated soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 105-109.
17. Días-Sala, C.; Hutchison, K.W.; Goldfarb, B. y 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.
18. Evans, D. E.; Briars, S. A. and Williams, L. E. 1991. Active calcium transport by plant cell membranes. *J. Exp. Bot.* 42(236): 285-303.
19. Evans, E. D.; Askerlund, P.; Boyce, J. M.; Briars, S. A.; Catos, D.; Coates, J.; Cooke, T. D.; Theodoulou. 1992. Studies on the higher plant calmodulin-stimulated ATPase. Transport and receptor proteins of plant membranes molecular structure and function. Plenum Press. New York and London.
20. Evans, E. D. 1994. Calmodulin-stimulated calcium pumping ATPases localized at higher plant intracellular membrane: a significant divergence from other eukaryotes? *Physiol. Plant.* 90:420-426.
21. Evans, E. D. y Williams, E. L. 1998. P-type calcium ATPases in higher plants- biochemical, molecular and functional properties. *BBA* 1376:1-25.
22. Fabiato, A. 1988. Computer programs for calculating multiple metal and ligands. *Methods in enzymol.* Fleischer, S. y Fleischer, B. Eds. 157:378-416. Academic press, California.
23. Felle, H. 1988. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 174:495-499. bn

24. Garram, P. J.; Rega, A. F. 1990. Plasma membrane calcium pump. In: intracellular calcium regulation. Bronner, F. Ed. Wiley-Liss. N Y. 271-303 pp.
25. Geisler, M.; Axelsen, K. B.; Harper, J. F.; Palmgren, M. G. 2000. Molecular aspects of higher plant p-type Ca²⁺-ATPases. *BBA*. 1465:52-78.
26. Gilroy, S.; Blowers, D. P. y Trewabas, A. J. 1986. The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. *FEBS Lett*. 199:217-221.
27. Graziana, A. ; Fosset, M.; Ranjeva, R.; Hetherington, A.M. and Lazdunski, M. 1988. Ca²⁺ channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca²⁺ entry into protoplasts. *Biochemistry* 27:764-768.
28. Hepler, P. K. and Wayne, R. O. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:397-439.
29. Honda, C.; Komatsu, S. y Hirano, H. 1994. A calcium-and phospholipid-dependent protein kinase in soybean. *Phytochem.* 35(6):1407-1411.
30. Hsieh, W.L.; Pierce, W.S.; Sze, H. 1991. Calcium-pumping ATPases in vesicles from carrot cells. Stimulation by calmodulin or phosphatidylserine and formation of a 1120 kilodalton phosphoenzyme. *Plant Physiol.* 97:1535-1544.
31. 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.
32. 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.
33. Kaus, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:47-72.
34. Kluesener, B.; Boehm, 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.
35. Kurosaki, F. 1997. Stimulation of Ca⁺⁺-pumping ATPase activity in carrot plasma membrane vesicle. *Physiol. Plant.* 83:535-543.

36. Li, Y.; Liu, Z-B Shi, X.; Hagen, G. y Guylfoyle, T.J. 1994. An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters. *Plant Physiol.* 106:37-43.
37. Liu, Z.H.; Li, H.Y. y Wang, H.Y. 1996. Effect of nlight on endogenous indole-3-acetic acid peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 37(2):113-119.
38. Leuba, V. and D. Le Tourneau. 1990. Auxin activity of phenylacetic acid in tissue culture. *J. Plant Growth Reg.* 9:71-76.
39. Marmè, D. 1985. The role of calcium in the regulation of plant metabolism. *Physiol. Vég.* 23:945-953.
40. Michelet, B. y Boutry, M. 1995. The plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 108: 1-6.
41. Morrè, D. J.; Brightman, A. O. y Sandelius, A. J. 1987. Membrane fractions from plant cells en Biological membranes a practical approach. Findlay, J.B.C. y Evans, W.H. Editores. IRL Press. Inglaterra. 5-31 pp.
42. Muchhal, U.S.; Liu, C. And Raghothama, K.G. 1997. Ca²⁺-ATPase is expressed differentially in phosphate-starved roots of tomato. *Physiol.Plant* 101:540-544.
43. 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.
44. Napier, R. M. and M. A. Venis. 1990. Receptors for plant growth regulators: Recent advances. Journal of Plant Growth regulators: Recent advances. *J. Plant Growth Reg.* 9:113-126.
45. Naiper, R.M. 1995. Towards an understanding of ABP1. *J. Exp. Bot.* 46(293):1787-1795.
46. Nelson, N. 1988. Structure, Function, and evolution of proton-ATPases. *Plant Physiol.* 86: 1-3.
47. Nikolayevich, S.S.; Anstruther N.I.; and Morris, J. 1997. Oscillations in H⁺ and Ca²⁺ ion fluxes around the elongation region of corn roots and effects of external pH. *Plant Physiol* 113:111-118.

48. Nordstrom, A. C. and Eliason, L. 1991. Levels of indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspartic acid during adventitious root formation un pea cuttings. *Physiologia plantarum* 82:599-605.
49. Olbe, M. and Somarin, M. 1991. ATP-dependent Ca^{++} -pumping ATPase activity in carot plasma membrane by calmodulin. *Phytochemistry*. 45(6):1097-1100.
50. Overvoorde, P. J. y Grimes, H. D. 1994. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell Physiol*. 35(2):135-144.
51. Packer, L.; Douce, R. (Ed.) 1987. Plant cell membranes en *Methods in Enzymology* Vol. 148. Academic Press, Inc. USA. 106-111 pp.
52. Peñalosa, C.I. 1998. Efecto del AIB, el AIA y el floroglucinol sobre la respiración en mitocondrias aisladas y la actividad de auxina oxidasas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias-UNAM. 120-133 pp.
53. Pfeiffer, W. ; Hager, A. A. 1995. ATPase and a $\text{Mg}^{+2}/\text{H}^{+}$ antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L. *Planta* 191:373-385.
54. Rasi-Caldongo, F.; Carnelli A. y De Michelis, M.I. 1995. Identification of the plasma membrane Ca^{+2} -ATPase and of its autoinhibitory domain. *Plant Physiol*. 108:105-113.
55. Rayle, D. L. and Cleland, R. E. 1977. Control o plant cell enlargement by hydrogen ions. *Cur. Top. Dev. Biol*. 11: 187-214.
56. Reid, R. J. Y Smith, F.A. 1992. Regulation of calcium influx in *Chara*. Effect of K, pH, metabolic inhibition and calcium channel blockers. *Plant Physiol* 100:637-643.
57. Rengel, Z. y Elliot, D.C. 1992. Mechanism of aluminium inhibition of net Ca^{2+} uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol*. 98:632-638.
58. Riov, J. y Yang, S.F. 1989. Enhancement of adventitious root formation in mung bean cuttings by 3,5-dihalo-4-hidroxybenzoic acids and 2,4-dinitrophenol. *Plant. Growth Regulation* 8:277-281.
59. Rottenberg, H. and Moreno-Sanchez, R. 1993. the proton pumping activity of H^{+} -ATPases: an improved fluorescence assay. *BBA* 1183:161-170.

60. Salisbury, F. B. y Ross, C.W. 1994. Fisiología vegetal. 4ª ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México. Pág. 395.
61. Serrano, 1990. Plasma membrane ATPase. The plant Plasma Membrane. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. 125-149 pp.
62. Sommarin, M. y Sommarin, A. 1996. Calcium efflux transporters in higher plants. Smallwood, M. Knox, J.P. and Bowles, D.J. eds. Membranes: Specialized functions in plants. Bios Scientific Publishers. 281-299 pp.
63. Shiina, T. y Tazawa, M. 1987. Demonstration and characterization of a Ca^{2+} channel in tonoplast free-cells of *Nitellopsis obtusa*. *J. Membrane Biol.* 96:263-276.
64. Schumaker, K.S. y Sze, K. 1987. Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.* 262:3944-3946.
65. Terry, B. R.; Findlay, G. P. y Tyerman, S.D. 1992. Direct effects of Ca^{+2} -channel blockers on plasma membrane cation channels of *Amaranthus tricolor*-protoplasts. *J. Exp. Bot.* 43(256): 1457-1473.
66. Theodoulou, F. L.; Dewey, F. M.; Evans, D. E.. 1994. Calmodulin-stimulated ATPase of maize cells: functional reconstitution monoclonal antibodies and subcellular localization. *J. Exp. Bot.* 45:1553-1564.
67. Thomson, L. J.; Xing, T.; Hall, J. L. y Williams, L. E. Investigation of the calcium-transporting ATPases at the endoplasmic reticulum and plasma membrane of red beet (*Beta vulgaris*). *Plant Physiol.* 102:553-564.
68. Viesser, E. J. W.; Heijink, C. J.; Van Hout, J. G. M.; Vasenek, A. C. J.; Barendse, G. W. M. y Blom, C. W. M. 1995. Regulatory role of auxin in adventitious root formation in two species of *Rumex* differing in their sensitivity to waterlogging. *Physiologia Plantarum* 93:116-122.
69. Wang, M.; Van Duijn, B.; Schram, A.W. 1991. Abscisic acid induces a cytosolic calcium. *Febs Lett.* 278: 69-74
70. Wharton, D. C. y McCarty, R. E. 1972. Experiments and methods in Biochemistry. McMillan NY.

71. Zocchi, G. y Robotii, G. 1993. Calcium transport in membrane vesicles isolated from maize coleoptiles. Effect of indoleacetic acid and fusicoocin. *Plant Physiol.* 101:135-139.