



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE AUXINAS Y LA
EVALUACIÓN DE SU EFECTO PROMOTOR DE
RAÍCES ADVENTICIAS EN *Dendranthema
grandiflora* y *Dianthus caryophyllus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA VEGETAL)

P R E S E N T A

BIÓL. RAFAEL EMILIANO QUINTANAR ZÚÑIGA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2008



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.

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Morfología y Función, y en los laboratorios de Biogeoquímica y de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, en la FES-Iztacala UNAM.

Agradezco profundamente a mi director de tesis, el Dr. César Mateo Flores Ortiz todo el apoyo brindado para el desarrollo teórico y experimental de esta investigación, que fue mucho más allá de los límites de su función.

También al Dr. Ignacio Peñalosa Castro por todas las facilidades brindadas para esta investigación.

Al Ing. Armando García Frías, del ICAMEX, por su valiosa aportación en los aspectos agronómicos de este trabajo.

A todo el grupo de sinodales, cuyas acertadas directrices consolidaron la versión final de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE CUADROS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
ANTECEDENTES.....	8
Las auxinas como fitohormonas.....	8
La formación de raíces adventicias.....	11
Metabolismo de auxinas.....	14
AIA-oxidasa y rizogénesis.....	22
Derivados conjugados de auxinas.....	23
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	29
MÉTODOS.....	30
Síntesis química de los derivados del ácido Indol-3-Acético..	30
Material biológico.....	30
Bioensayo con crisantemo	30
Bioensayo con clavel	31
Evaluación de la capacidad rizogénica.....	31
Obtención de la muestra.....	32
Determinación polarográfica de actividad oxidasa	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES.....	65
REFERENCIAS.....	66

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Estructuras químicas correspondientes a algunas auxinas naturales y sintéticas típicas.....	10
Figura 2. Biosíntesis del AIA a partir del triptófano.....	16
Figura 3. Biosíntesis del AIA independiente de triptófano.....	17
Figura 4. Productos formados en la oxidación descarboxilativa del AIA.....	18
Figura 5. Productos formados en la oxidación no descarboxilativa del AIA..	19
Figura 6. Conjugación del AIA.....	27
Figura 7. Espectro UV del Derivado 1.....	36
Figura 8. Espectro IR del Derivado 1	36
Figura 9. Termograma del Derivado 1	37
Figura 10. Espectro de masas del Derivado 1	37
Figura 11. Patrón de fragmentación propuesto para el indol-3-acetato de <i>p</i> -nitrofenilo (Derivado 1).....	38
Figura 12. Espectro UV del Derivado 2	41
Figura 13. Espectro IR del Derivado 2	41
Figura 14. Termograma del Derivado 2.....	42
Figura 15. Espectro de masas del Derivado 2.....	42
Figura 16. Patrón de fragmentación propuesto para el indol-3-acetato de <i>p</i> -nitrofenilfosfato (Derivado 2).....	43
Figura 17. Espectro UV del Derivado 3	46
Figura 18. Espectro IR del Derivado 3	46
Figura 19. Termograma del Derivado 3.....	47
Figura 20. Espectro de masas del Derivado 3.....	47
Figura 21. Patrón de fragmentación propuesto para el naftalén-3-acetato de <i>p</i> -nitrofenilo (Derivado 3).....	48
Figura 22. Espectro UV del Derivado 4.....	51
Figura 23. Espectro IR del Derivado 4.....	51
Figura 24. Termograma del Derivado 4.....	52
Figura 25. Espectro de masas del Derivado 4.....	52
Figura 26. Patrón de fragmentación de masa propuesto para el Naftalenacetato de <i>p</i> -nitrofenilfosfato (Derivado 4)	53
Figura 27. Enraizamiento en crisantemo (var. Polar) expresado como	

porcentaje de esquejes que generaron raíces adventicias (n=5)..	55
Figura 28. Enraizamiento en crisantemo (var. Polar) expresado como número de raíces por esqueje (n=5).....	55
Figura 29. Actividad de AIAox durante el enraizamiento de crisantemo var. Polar).....	56
Figura 30. Enraizamiento en clavel var. América.....	57
Figura 31. Actividad de AIAox durante el enraizamiento de clavel var. Polar.....	58
Figura 32. Actividad de AIAoxidasa purificada.....	59

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Constantes espectroscópicas del indol-3-acetato de <i>p</i> -nitrofenilo (Derivado 1)	35
Cuadro 2. Constantes espectroscópicas del indol-3-acetato de <i>p</i> -nitrofenilfosfato (Derivado 2)	40
Cuadro 3. Constantes espectroscópicas del naftalenacetato de <i>p</i> -nitrofenilo (Derivado 3).....	45
Cuadro 4. Constantes espectroscópicas del naftalenacetato de <i>p</i> -nitrofenilfosfato (Derivado 4)	50

RESUMEN

Una de las funciones reguladas por el AIA es la promoción de raíces adventicias. En distintos trabajos se ha probado diferentes derivados auxínicos que incrementan la rizogénesis promovida por el AIA. En este proyecto se plantearon los siguientes objetivos: El diseño y síntesis de cuatro conjugados auxínicos con potencial de incrementar el efecto rizogénico del ácido indol-3-acético (AIA) y la evaluación preliminar de su capacidad rizogénica a través de ensayos en invernadero con clavel (*Dianthus caryophyllus*) y crisantemo (*Chrysanthemum grandiflora*). Adicionalmente, se registró la actividad de la AIA-oxidasa purificada de crisantemo y clavel durante el enraizamiento para evaluar su actividad en presencia de los derivados sintetizados. Para llevar a cabo los objetivos planteados, se sintetizaron los conjugados de auxinas mediante la reacción de acoplamiento de ésteres empleando dicitclohexilcarbodiimida como agente acoplante. Los cuatro derivados obtenidos fueron: indol-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 1), indol-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 2), naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 3) y naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 4), los cuales fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas de UV, infrarrojo y espectrometría de masas. Los derivados se sintetizaron con un rendimiento de 60% para el Derivado 1, 30% para el Derivado 2, 50% para el Derivado 3 y 40% el Derivado 4. El bioensayo de enraizamiento permitió observar que el Derivado 1 induce un incremento de 150% en el enraizamiento de esquejes de *D. grandiflora* y de 100% en esquejes de *D. caryophyllus* con respecto del control. Lo anterior es especialmente importante considerando que *D. caryophyllus* es una especie considerada de difícil enraizamiento. La actividad de AIA oxidasa mostró una tasa de actividad menor en presencia del Derivado 1, lo cual se discute en función de que la modificación química resulta en una mayor permanencia de los derivados y en consecuencia un mayor efecto rizogénico.

INTRODUCCIÓN

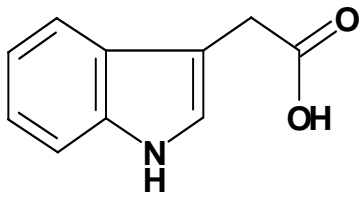
Las auxinas son fitohormonas que regulan diversos procesos fisiológicos relevantes en las plantas, tales como la elongación celular, el fototropismo o la formación de raíces adventicias (Acosta *et al*, 2000). En los últimos años, el grupo de trabajo del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FESI desarrolla una línea de investigación sobre la participación de las auxinas en el enraizamiento adventicio a través de bioensayos con epicotilos y la evaluación de la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido indol-3-acético (AIA), la auxina más estudiada hasta el momento. Es un hecho conocido que la aplicación exógena de AIA incrementa la formación de raíces adventicias en numerosas especies, lo que permite a la planta un rápido establecimiento en el sustrato y periodo de desarrollo mucho más corto que si se propagara por semilla. Diversos autores han probado compuestos derivados y análogos que presentan el efecto enraizador de la auxina natural (Nordström *et al.*, 1991, Haissig *et al.*, 1992). La conjugación del AIA con otras moléculas como glúcidos o aminoácidos es un mecanismo natural que existe en las plantas como parte de la regulación metabólica de esta fitohormona, y se ha demostrado que los conjugados también tienen efecto inductor de raíces adventicias (Bartel, *et al*, 2001). Este trabajo de tesis surge a partir de estudios previos que se realizaron en nuestro grupo de trabajo, donde se diseñaron, se sintetizaron y se evaluaron en bioensayos diferentes conjugados de AIA, con el fin de encontrar alguno que potenciara el efecto inductor de raíces adventicias. A partir de estos ensayos previos se seleccionaron 4 conjugados: *p*-nitrofenil-indol-3-acetato, *p*-nitrofenil-naftalenacetato y sus respectivas formas fosforiladas. El potencial enraizador de estos se evaluó en especies florícolas de importancia comercial, como el crisantemo (considerado de fácil enraizamiento) y el clavel (considerado de difícil enraizamiento). La búsqueda y aplicación de nuevos derivados hormonales puede contribuir por lado al conocimiento básico de los aspectos relacionados con el metabolismo del AIA y por otra parte generar nuevos productos que puedan ser usados en la práctica agrícola y comercial.

ANTECEDENTES

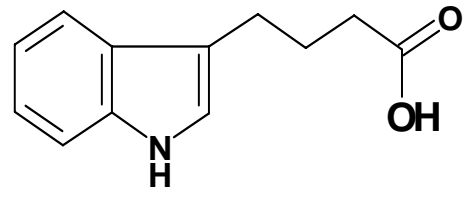
Las auxinas como fitohormonas.

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, llamado tropismo (Taiz y Zeiger, 2002). Las auxinas presentes en plantas son el AIA, del cual se conocen los efectos más que el de otras auxinas; el ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-AIA), que se encuentra en semillas jóvenes de varias leguminosas; el ácido fenilacético (APA), que con frecuencia es más abundante que el AIA, aunque mucho menos activo (Wightman y Thimann, 1980), y el ácido indol-3-butírico (AIB) presente en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas (Schneider y Wightman, 1974; Epstein y Ludwig-Müller., 1993). También existen algunos compuestos sintéticos que ocasionan respuestas fisiológicas similares al AIA, como el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (AMCP) (Salisbury y Ross, 1994) (Figura 1).

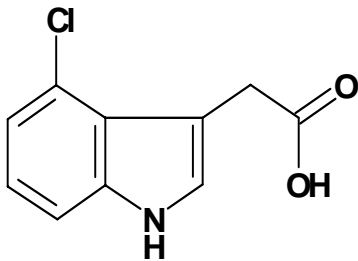
Los tejidos jóvenes son los sitios de síntesis del AIA, y se considera que hay una mayor participación del meristemo apical, de donde es transportado hacia tallos y raíces; su acción depende del estado de desarrollo del órgano o tejido, de su concentración y de la proporción a la que se encuentre con respecto a otros fitorreguladores (Srivastava, 2002). Por otro lado, 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). Entre los trabajos más recientes sobre auxinas involucran los genes relacionados con la respuesta auxínica (Casson and Lindsey, 2003), los mecanismos transcripcionales (Quint y Gray, 2006) y los aspectos cinéticos de las enzimas que participan en la síntesis y degradación de las auxinas (Syros *et al.*, 2004).



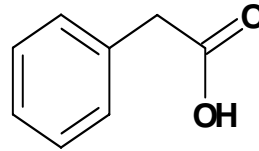
Ácido Indol-3-acético



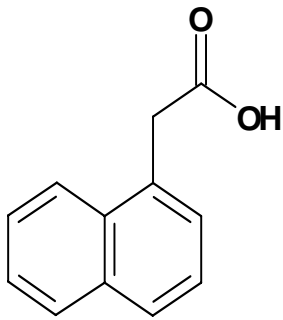
Ácido Indol-3-butírico



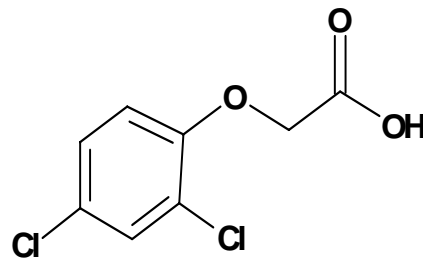
Ácido 4-Cl-Indol-3-acético



Ácido fenilacético



Ácido α -naftalenacético



Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Figura 1. Estructuras químicas correspondientes a algunas auxinas naturales y sintéticas típicas. (tomado de Acosta *et al*, 2000).

La formación de raíces adventicias

La generación de raíces adventicias involucra una gama de procesos que incluyen su diferenciación a partir de células específicas del tallo, su emergencia, su vascularización específica y el control del ángulo de desarrollo. Las raíces adventicias son importantes porque ante el daño o pérdida de la raíz principal la planta puede generar raíces adventicias que le permitan continuar su adecuada fijación al sustrato y proseguir con las funciones básicas de absorción de agua y nutrientes. En la práctica florícola, la propagación de esquejes promovida por enraizamiento adventicio representa una etapa importante para acelerar la producción y tener un mayor un rendimiento productivo.

El AIA fue la primera hormona vegetal empleada para el enraizamiento (Cooper, 1935), y en el mismo año Zimmerman y Wilcoxon (1935) descubrieron que varias auxinas sintéticas promovían el enraizamiento. Cuando se descubre que las auxinas desempeñan un importante papel en la formación de raíces, se pensó que las estacas que no enraizan fácilmente carecían de niveles adecuados de auxinas y que al proporcionárseles exógenamente auxinas podrían enraizar (Blakesley *et al.*, 1991). Numerosos trabajos se han realizado a partir de este descubrimiento, encontrándose en la mayoría de los casos un incremento significativo en el número de raíces producidas al tratar esquejes de plantas con auxinas (Nordström *et al.*; 1991, Haissig *et al.*, 1992, De Vier y Geneve, 1997; Pierik *et al.*, 1997, Guerrero *et al.*, 1999; Tanimoto, 2005; Stefancic *et al.*, 2006).

Las hojas y yemas, que son sitios conocidos de producción de auxina (Moore, 1969), son necesarias para la iniciación de raíces en varias especies y cuando son eliminadas y se aplica auxina existe un estímulo parcial o completo en el enraizamiento de varias especies (Roberts y Fuchigami, 1973; Haissig, 1970b; Eriksen y Mohamed, 1974). La lista de especies vegetales que responde a la aplicación de auxinas es extensa (Hartmann *et al.*, 1990; Bachelard y Stowe, 1963; Weaver, 1972). La concentración efectiva al aplicar auxinas exógenas depende de la variabilidad genética interespecífica (Thimann y Delisle, 1942). Se han estudiado diversas sustancias que funcionan como auxinas (Figura 1): el AIA y AIB como los más comunes, y los ácidos indolpropiónico (AIP),

naftalenacético (ANA), benzofurano acético, 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2-metil-4-clorofenoxipropiónico (MCCP).

Se acepta generalmente que las auxinas funcionan sobre todo en los primeros estadios de diferenciación para la formación de primordios de raíces. Haissig (1970a) encontró que al aplicar (^{14}C -AIA) las células de los primordios de la raíz lo incorporan, sobre todo en la fase más temprana de la iniciación de este proceso. Smith y Thorpe (1975a y b,) encontraron en cortes histológicos de pino, que las auxinas promueven sobre todo la formación de los primeros estadios de diferenciación.

Las variantes estructurales de las auxinas pueden ser más eficientes para diferentes procesos. El AIA es el menos estable (Bachelard y Stowe, 1963), y al menos en cereales, el MCCP (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981) estimula el alargamiento, mientras que el AIB y el ANA muestran una mayor eficiencia en la formación de las raíces (Álvarez *et al.*, 1989). Se ha propuesto que la mayor estimulación que promueven el AIB y el ANA puede deberse a la carencia de la maquinaria para su degradación, pero Riov y Epstein (1988) mostraron en *Phaseolus mungo* que las velocidades de degradación del AIA y el AIB son similares, 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 (Peñalosa, 1998).

La regeneración de raíces o la formación de raíces adventicias en segmentos de tallo u hoja comprende 4 etapas principales: 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) la formación de la raíz por crecimiento en extensión de las células producidas por el meristemo (Acosta *et al.*, 2000). 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 (1975a), 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 células adyacentes. Estos eventos tempranos parecen característicos de un locus meristemático y han sido reportados en otras especies entre las cuáles se cuenta el fríjol mungo (Blazich y Heuser, 1979).

La generación de raíces en posición próxima al cilindro vascular puede deberse a la presencia de reguladores endógenos del crecimiento u otras sustancias en ésta, a una incorporación incrementada de reguladores de crecimiento exógenos o una combinación de ambas situaciones (Atfield y Evans, 1991). 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 11 células “localizadoras” dentro del periciclo (Scheres *et al*, 1996).

Se han reconocido 2 patrones de formación de raíces en segmentos tanto en plantas herbáceas como leñosas. 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. El segundo patrón es la formación indirecta de raíces adventicias que involucra 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 (Hartman *et al.*, 1990).

Debe distinguirse entre los primordios de raíz que han sido inducidos *de novo* y aquellos que son preformados. Los raíces adventicias inducidas son aquellos que se forman en respuesta a la herida que resulta de realizar cortes, a partir de los segmentos obtenidos (Blakesley *et al.*, 1991). Las raíces 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).

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 tratado puede ser transferido a un medio libre de auxinas, o puede usarse la combinación de aplicación de luz y riboflavina para oxidar el AIB (Gorst *et al.*, 1983).

Metabolismo de auxinas

Hasta que se desarrollaron métodos de separación más eficientes como la cromatografía de gases-espectrofotometría de masas o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se había dificultado la determinación precisa del AIA en tejidos vegetales (Schneider y Wightman, 1974). Se ha reconocido como precursor inicial del AIA el 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 suinus* forman AIA cuando se alimentan con triptófano. Se ha mostrado también, con experimentos *in vivo* que el triptófano marcado con ^{14}C puede ser convertido en AIA en rebanadas de sandía, tallos de tomate, frutos de lima, tallos de tabaco, hipocótilos de pepino y preparaciones libres de células de frijol mungo entre otras especies (Schneider y Whigtman, 1974).

Gaspar y Hofinger (1988) describen que el triptófano puede seguir 3 rutas (Figura 2) alternativas hacia la formación del AIA: 1) El triptófano se transamina produciendo indolpiruvato, mediante la triptófano aminotransferasa; el indolpiruvato se descarboxila formando indolacetaldehído y éste último se oxida (en frijol mungo) mediante la indolacetil deshidrogenasa-NAD dependiente. 2) El triptófano se descarboxila mediante la triptófano descarboxilasa para

transformarse en triptamina, que su vez se transforma en indolacetaldehído por la acción de una aminaoxidasa. 3) Se forma indolacetaldoxina 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 *et al.*, (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 (Schneider y Wightman, 1974). Se ha reportado indolacetaldoxima como producto de la oxidación del triptófano mediante una peroxidasa catiónica en *Arabidopsis thaliana* (Ludwig-Muller y Epstein, 1993). (Figura 3).

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 de manganeso y /o monofenoles como cofactores, se considera constituido por una o más isoperoxidasas. Cualquier tipo de peroxidasas puede degradar al AIA *in vitro*, pero sólo las peroxidasas básicas (catiónicas) actúan como AIA-ox *in vivo* (Gaspar et al., 1982). Hay dos principales vías del catabolismo del AIA en plantas (Figura 4): una oxidación descarboxilativa y una vía no descarboxilativa que produce ácido oxindol-3-acético y sus derivados hidroxilados (Reinecke y Bandurski, 1988). La vía oxidativa-descarboxilativa, tiene como principales productos descarboxilados al indol-3-metanol, al 2- hidroximetiloxindol (Grambow y Lagenbeck , 1983; García, *et al.*, 1992), 3-metilenoxindol (Schneider y Wightman, 1974) 3- hidroximetiloxindol e indol 3- aldehído (Nakono *et al.*, 1982).

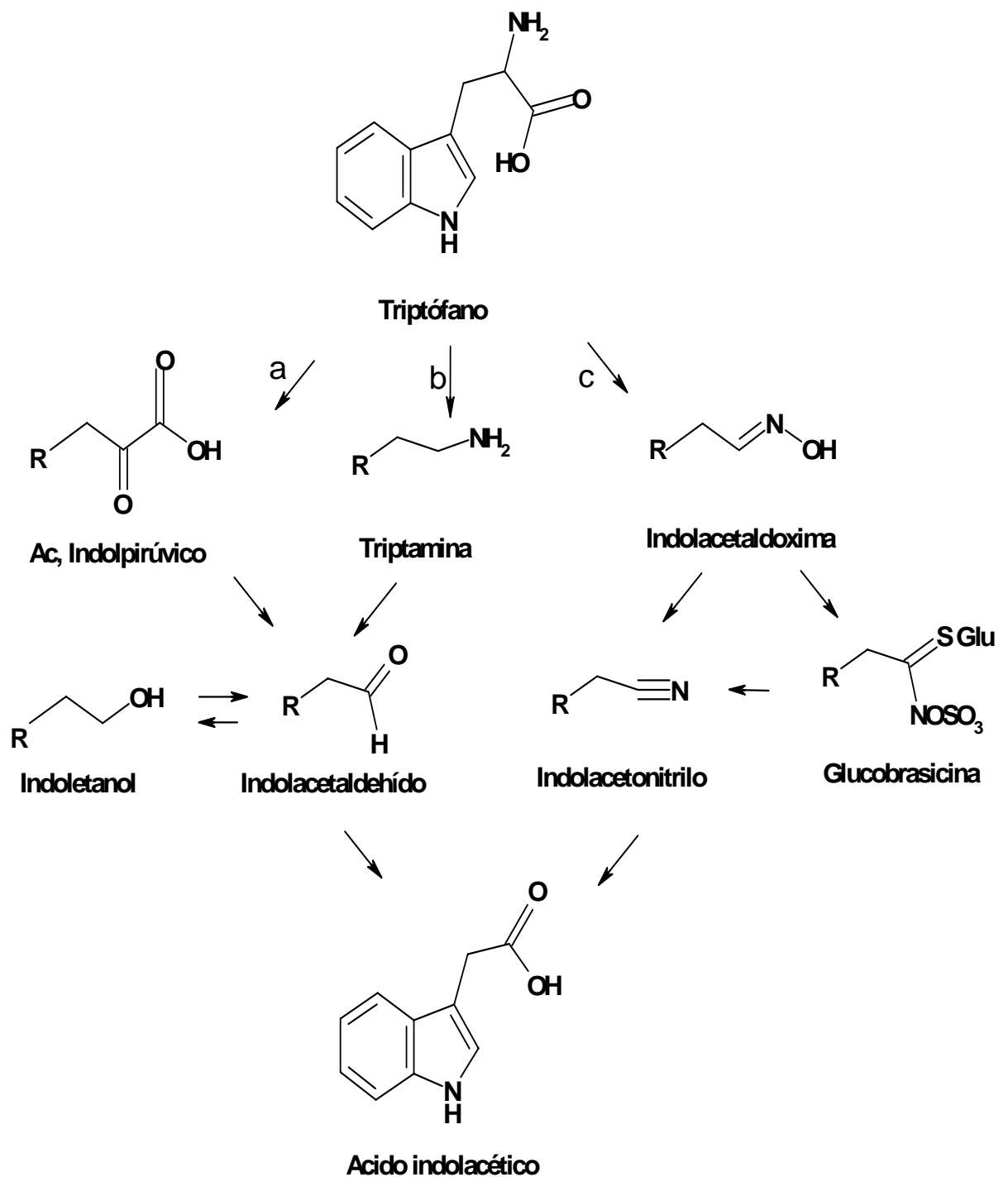


Figura 2. Biosíntesis del AIA a partir del triptófano: a) Ruta del ácido indolpirúvico; b) ruta de la triptamina; c) ruta de la indolacetaldoxima. (R=anillo indólico) (tomado de Acosta *et al.*, 2000).

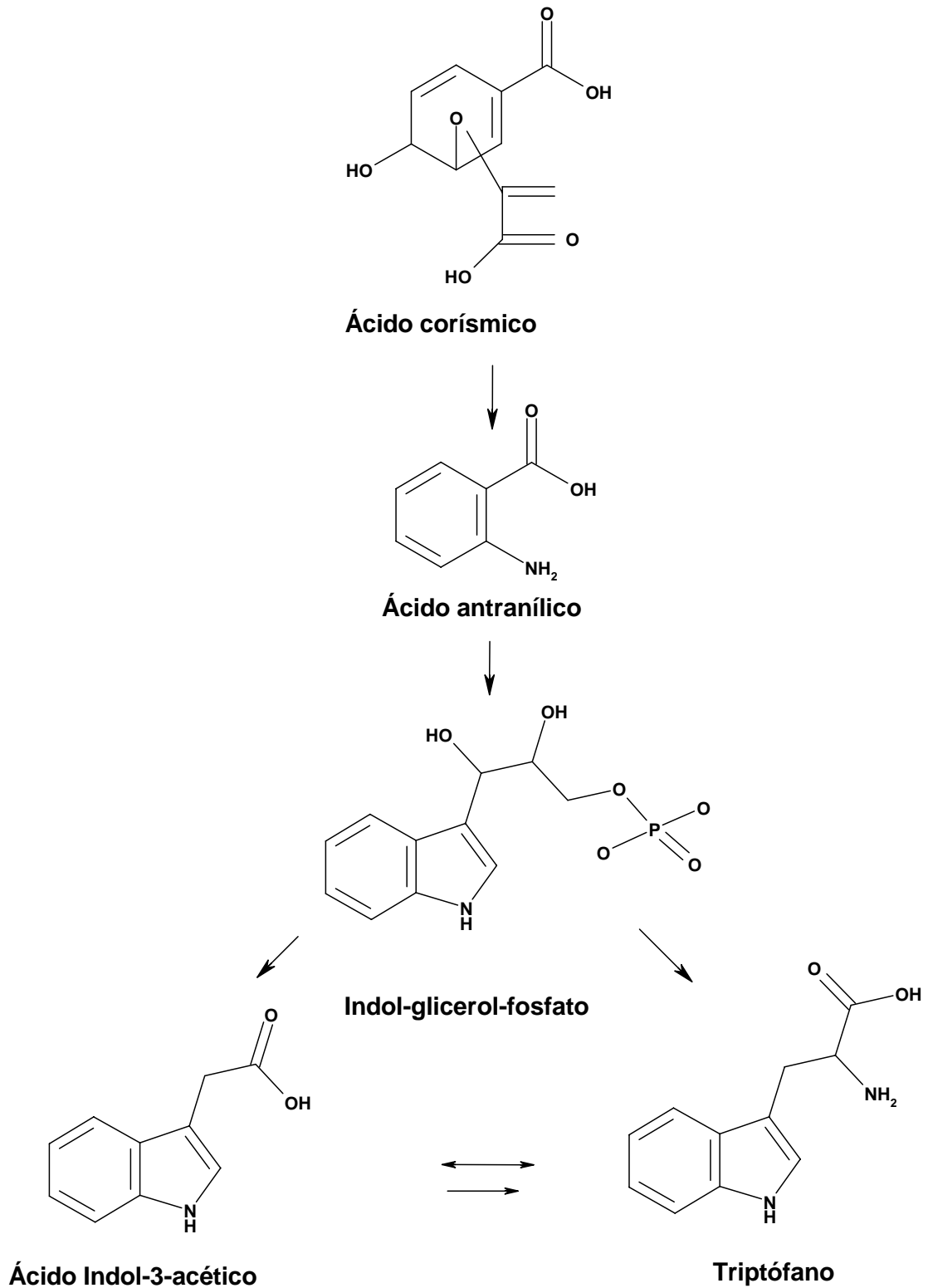


Figura 3. Biosíntesis de AIA independiente de triptófano. El AIA puede sintetizarse, el indol-glicerol-fosfato en una ramificación de la ruta del ácido sikímico, ruta general de síntesis de anillos aromáticos, a partir de un precursor del triptófano (tomado de Acosta *et al.*, 2000).

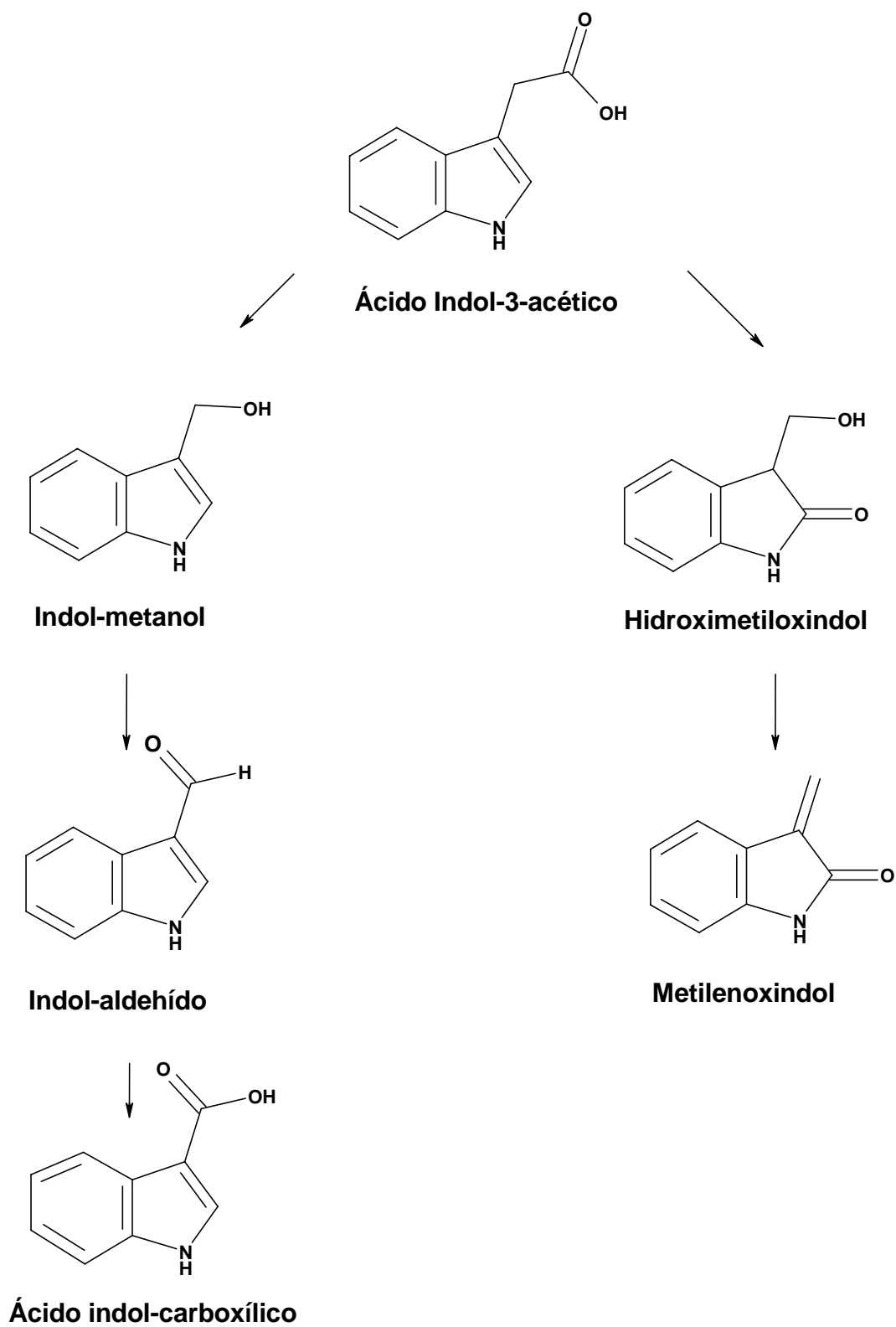


Figura 4. Productos formados en la oxidación descarboxilativa del AIA (tomado de Acosta *et al.*, 2000).

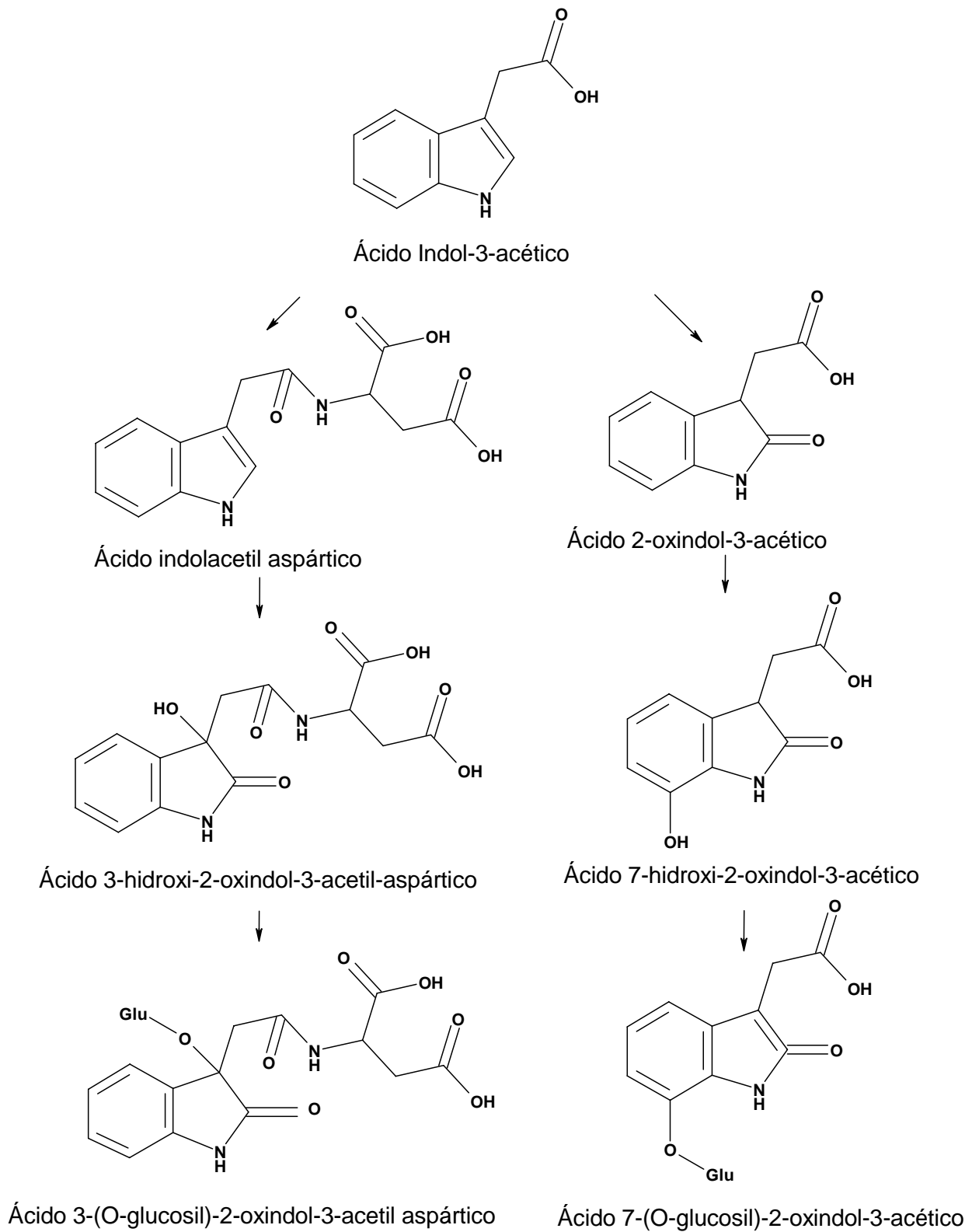


Figura 5. .Productos formados en la oxidación no descarboxilativa del AIA (tomado de Acosta *et al.*, 2000).

Dependiendo de las condiciones físicas y bioquímicas en el interior celular, el AIA que es degradado por las peroxidasas puede producir 3-metilenoxindol o indol-3-aldehído (Grambow y Lagenbeck, 1983). Syberg *et al.*, (1984) han encontrado indolmetano y ácido indolcarboxílico como constituyentes naturales en tejidos de pino, que probablemente deriven del indolaldehído.

La oxidación del AIA es afectada por compuestos fenólicos tanto de alto como de bajo peso molecular (Mato *et al.*, 1988; Hartman *et al.*, 1990), por manganeso (Gaspar *et al.*, 1982), ácidos carboxílicos (malato, citrato, piruvato) y otros aniones (Pressey, 1990). La actividad protectora hacia la oxidación de auxinas que muestran las coumarinas y algunos fenoles parece involucrar la reacción preferencial con algunos estados de transición de las peroxidasas.

Mecanismos de acción de auxinas

Existen diversas hipótesis sobre el modo de acción de las auxinas para la promoción de raíces adventicias. Se ha demostrado que la auxina induce rápidamente la transcripción de genes específicos en sistemas de células que responden ya sea por división celular o elongación celular (Key, 1989). Mennes *et al.*, (1992) reportan que el tratamiento con 2, 4-D en cultivos de células de tabaco en suspensión privados de auxina resulta en una acumulación significativa de 7 tipos distintos de RNAm dentro de un intervalo de 15-30 min.

Napier y Venis (1995) señalan que las auxinas inducen cambios en la actividad de los genes tanto en células que responden predominantemente por división como en aquellas que lo hacen por elongación. Muchos de los cambios se detectan sólo después de periodos largos y persisten por muchas horas, particularmente en tejidos que se dividen, mientras que otros ocurren en lapsos cortos (durante los primeros 20 min después de la aplicación de auxinas).

En diversos estudios se ha encontrado que los productos de la expresión de los genes activados por las auxinas incluyen 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). 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 5-60 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).

Para que exista actividad auxínica, parece requerirse la estructura y características del grupo indol, o de estructuras semejantes; el ácido 1,2-benzisoxazol-3-acético (con actividad similar a auxina) no incrementa su actividad al insertarle en el anillo aromático átomos de cloro, lo que indica un mecanismo de acción de las auxinas consiste en dilucidar por qué el AIB parece más comportamiento diferente a otras auxinas sintéticas y sugiere que la actividad está relacionada principalmente con la estructura del pirrol fusionado (Acosta *et al.*, 2000).

Una aproximación relevante para comprender efectivo en la promoción rizogénica que el AIA. Se sugieren diversas explicaciones que resumen Nordstrom *et al.*, (1991) y Epstein y Ludwig-Muller, (1993):

- 1) El AIB es más estable en solución.
- 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. Según estudios de Ludwig-Müller y Epstein (1991), el AIB se incorpora más rápidamente.

El sistema más utilizado para estudiar el mecanismo de acción de las auxinas es el del alargamiento de coleótilos. 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, este proceso de reblandecimiento de la pared celular es 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).

Se ha encontrado que el AIA 10 μM causa un eflujo de protones que provoca un aumento de 15 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a partir de un flujo normal de 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$. La fusicoccina (que promueve la acidificación del apoplasto) provocó una elongación de 60-75% con respecto a la que es inducida por el AIA a 10 μM , lo que sugiere que la acidez inducida jugaría un papel 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 remueven las capas celulares para obtener evidencia que la sustente, y que la epidermis sea el tejido blanco para las auxinas; sin embargo, otras evidencias sugieren que debe reevaluarse el papel de la epidermis puesto que se ha demostrado que ésta no es el único tejido blanco para la elongación promovida por auxinas (Peters *et al.*, 1992).

AIA-oxidasa y rizogénesis

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 de este proceso de control a las peroxidasa, 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: H₂O₂ oxidorreductasa EC 1.11.1.7) puede utilizar, como su nombre lo indica, una variedad de donadores para reducir al oxígeno que constituye al H₂O₂.

En los 90's se descubrieron las formas múltiples de las especies de peroxidosas separables por electroforesis (Clarkson *et al.*, 1992). Tales isoenzimas se clasifican en formas catiónicas ó aniónicas, según se unan o no a la carboximetilcelulosa y de acuerdo a su capacidad de migración en el campo eléctrico (Shannon *et al.*, 1966, Johri, *et al.*, 2005). Las isoenzimas aniónicas y catiónicas del rábano silvestre (*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 diferencia en Km 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 peroxidosas 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 peroxidases 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 el 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 ión y recupera su actividad (Gaspar *et al.*, 1982).

Las peroxidases 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:

- a) Peroxidasa + H₂O₂ ----> Compuesto I
- b) Compuesto I + AH₂ ----> Compuesto II + AH + H₂O
- c) Compuesto II + AH₂ ----> Peroxidasa + AH + H₂O
- d) 2 AH ----> A + AH₂ (ó AH-AH)

Entre los mecanismos de reacción sugeridos para esta enzima destacan el de 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 oxiferroperoxidasa. 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 subsecuentemente 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).

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, 1996 y Talwar *et al.*, 1985). La segunda considera que los dos 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).

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 muy 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); (Figura 6). Entre los conjugados pueden mencionarse: AIA unido a proteínas, AIA-glucosa, AIA-aspártico e indol acetamida, además, se reportan conjugados de AIB, AIP y 2, 4-D con el ácido aspártico, así como la glucobrasicina y neoglucobrasicina (Kefeli, 1978). El

principal derivado conjugado del AIA es el indolacetilaspártato (Mollan, 1972; Sasaki, 1992).

La conjugación también puede jugar un papel en el catabolismo del AIA en algunas especies, como lo han establecido Tuominen *et al.*, (1995), al demostrar la conversión de 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-acetilacetato 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).

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 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 ésta 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). Más recientemente, Hangarter y Godd (1981) y Bialek *et al.*, (1983) muestran que los conjugados son biológicamente inactivos y hasta que son hidrolizados por enzimas de las plantas, demuestran actividad auxínica.

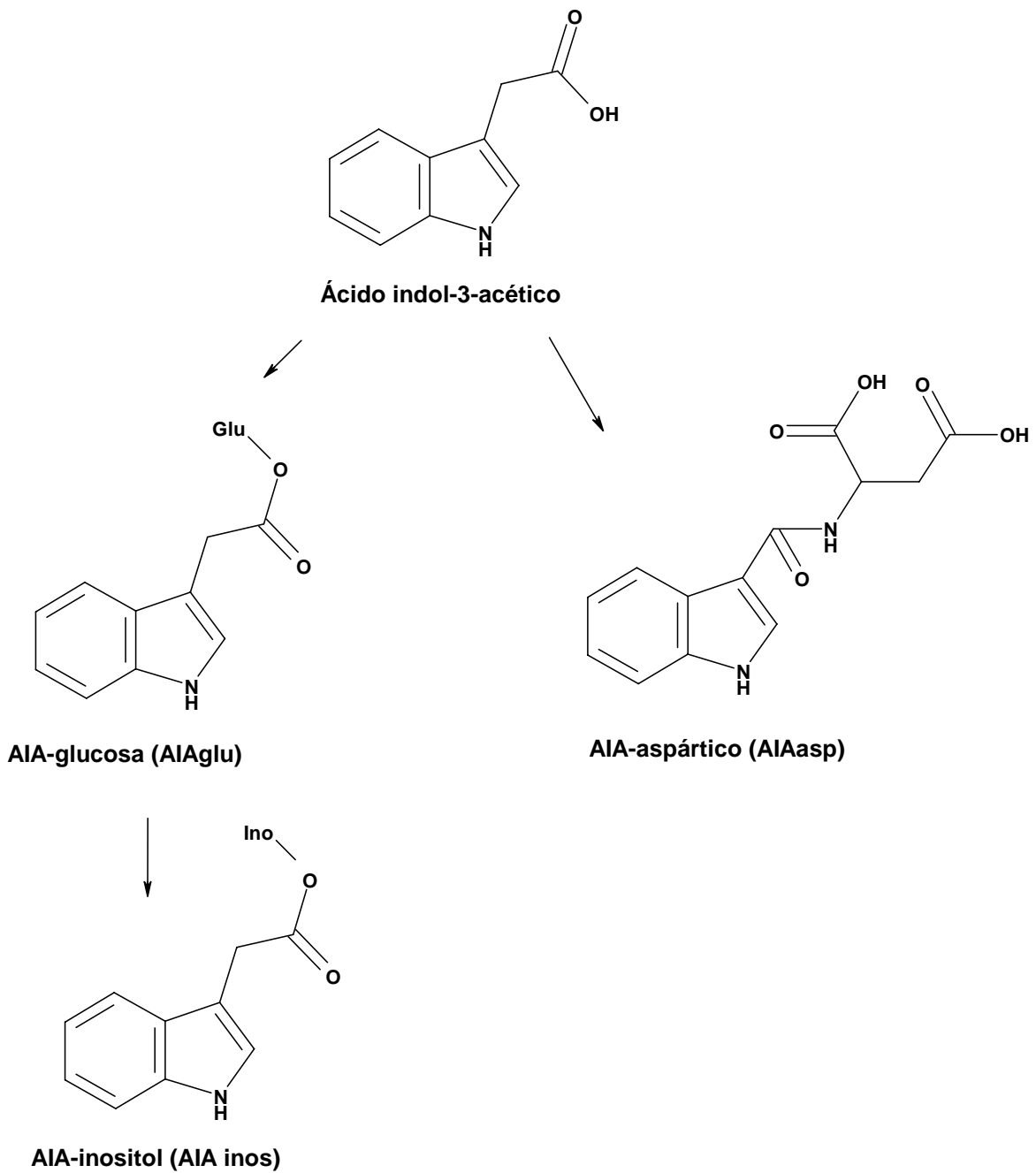


Figura 6. Conjugación del AIA. El AIA puede formar conjugados mediante enlaces éster con glucosa o inositol, o enlace amida con aminoácidos como el aspártico tomado de Acosta *et al*, 2000).

Por estos hechos, 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 (Wiesmann *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. La conjugación parece constituir un mecanismo por el cual las plantas enfrentan el exceso de auxina intracelular mediante un proceso reversible que funciona como un sistema homeostático para almacenar AIA y regular los niveles de AIA libre (Slovin *et al.*, 1999, Yee *et al.*, 2000, Rampey *et al.*, 2004).

En consideración de los antecedentes mencionados, en este trabajo se buscó modificar químicamente las auxinas AIA y ANA, a través de la obtención de sus conjugados mediante la síntesis de los ésteres correspondientes para evaluar si demuestran un mayor efecto promotor de raíces adventicias en especies florícolas. Con el presente trabajo se pretende contribuir al conocimiento básico del mecanismo de acción de las auxinas en la promoción de raíces adventicias y el desarrollo de nuevos tratamientos enraizadores, con mayor eficiencia para la propagación vegetativa de especies de interés florícola y hortícola.

HIPOTESIS

Los conjugados promoverán el enraizamiento de esquejes de clavel y crisantemo con mayor efectividad que el AIA, pues la esterificación a *p*-nitrofenil o *p*-nitrofenilfosfato permiten una mejor absorción y transporte al interior celular y favorecerá su permanencia en la planta, al evadir la acción degradativa de la AIA oxidasa.

Para probar ésta hipótesis se contemplaron los siguientes objetivos:

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Diseñar y sintetizar conjugados auxínicos que incrementen la capacidad de inducción de raíces adventicias del AIA.

Objetivos Particulares.

- Preparar conjugados de auxinas a través de la esterificación por acoplamiento con dicitclohexilcarbodiimida.
- Identificar por espectrometría de masas los derivados de auxinas sintetizados.
- Evaluar de manera preliminar la capacidad rizogénica de los conjugados sintetizados mediante bioensayos en invernadero con *D. caryophyllus* y *D. grandiflora*.
- Determinar el efecto de la modificación química de las auxinas en la actividad de la AIA oxidasa.

MÉTODOS

Síntesis química de los derivados del ácido Indol-3-acético

Se modeló por computadora la molécula del indol-3-acetato de *p*-nitrofenilo y naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilo usando el programa Némesis 1.1 (1992), el cual determina distintos parámetros cuánticos que permiten predecir su probable comportamiento químico. Posteriormente se realizó la síntesis utilizando la reacción general de esterificación de Mollan, *et al.* 1972, con las siguientes modificaciones: 1.15 g de AIA ó 1.22 g de ANA (6.6 mmoles) y 0.95 g de *p*-nitrofenol (6.6 mmoles) se disolvieron en 25 ml de acetato de etilo y se les agregó 1.37 g de dicitclohexilcarbodiimida (6.6 mmoles) en 5 ml de acetato de etilo. La mezcla se agitó durante 1 hr a 5 ° C y durante 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró la dicitclohexilurea y el filtrado se enfrió a 0 ° C. Se concentró y se cristalizó el éster. Para la síntesis de los otros dos derivados se incorporó un grupo fosfato usando *p*-nitrofenilfosfato en lugar de paranitrofenol. Los derivados se caracterizaron mediante el análisis de espectros de UV, IR y CG-MS. Los conjugados sintetizados fueron indol-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 1), indol-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 2), naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 3) y naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 4).

Material biológico

Bioensayo con crisantemo

En una primera evaluación, se emplearon esquejes de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. Polar), proporcionados por Ing. Armando García, de ICAMEX, cortados el día anterior y mantenidos a 3 °C en cámara de refrigeración. El grupo control consistió de 400 esquejes que fueron colocados dentro de los almácigos sin ningún derivado. Con base a ensayos preliminares realizados con hipocótilos de frijol mungo, se eligieron los siguientes tratamientos: 400 esquejes con solución del Derivado 1 100 ppm, 400 esquejes con solución de Derivado 1 1000 ppm, 400 esquejes con Derivado 1 en polvo (talco) 1000 ppm y 400 con enraizador comercial Radix® (ácido indol-3-butírico) en polvo 10,000 ppm. A todos los tratamientos se adicionó también

una solución de calcio-boro 100 µg/ml durante el riego, durante el periodo de enraizamiento. Se tomaron de cada tratamiento 20 esquejes para evaluar el enraizamiento y 2 para mediciones independientes de AIA oxidasa en extracto crudo a los días 5, 12, 19 y 26 días de aplicado el tratamiento.

Bioensayo con clavel

Después de la experiencia con el crisantemo, se decidió probar otros derivados con esquejes de clavel (*Dianthus caryophyllus*, var. América), proporcionados por Ing. Armando García, de ICAMEX. usando 400 esquejes para cada tratamiento y el grupo control. Se probó entonces, el efecto de los Derivado 1, 2, 3 y 4, todos aplicados en la base de los esquejes usando una concentración de 100 ppm en talco. Además se incluyeron tratamientos con Radix (10,000 ppm).

Los esquejes de ambas especies tenían de 8-10 cm de talla y se mantuvieron en almácigos con capacidad de 50 g de sustrato en cada celda. El sustrato consiste de una mezcla de agrolita:peat-moss en proporción 2:1 fertilizado con triple 17. Los almácigos se colocaron sobre cama de concreto dentro de un invernadero a una temperatura de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $70 \pm 5\%$. Fotoperiodo luz oscuridad de 12 hrs. La intensidad luminosa fue de $1200 \mu\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ seg}$. Los esquejes se regaron con un volumen total de 5 L dos veces al día. Una vez que formaron raíces se trasplantaron a suelo en otro invernadero con las mismas condiciones de luz, temperatura e intensidad luminosa, donde se mantuvieron hasta floración.

Evaluación de la capacidad rizogénica

Se evaluó el porcentaje de esquejes que formaron raíces adventicias, tomando al azar 20 esquejes de cada tratamiento en cada uno de los muestreos.

Se evaluó la concentración de proteína y la actividad de AIA oxidasa en los diferentes tratamientos a los 8, 16, 21 y 36 días después de que se aplicó el compuesto.

Obtención de la muestra

Se prepararon extractos de la zona basal del esqueje que generó raíces adventicias homogeneizando 3 g de tejido en 6 ml de medio de homogeneización que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7.6 y PVP 0.1%. El homogeneizado fue filtrado a través de gasa y centrifugado a 18 000 xg durante 5 minutos; el sobrenadante así obtenido se empleó para medir la actividad de AIA oxidasa. Para expresar la actividad enzimática se cuantificó la proteína total del extracto por el método de Bradford (1976).

Determinación polarográfica

Para la determinación polarográfica de la actividad de AIA-oxidasa se utilizó un oxímetro Hansatech mod. CB1-D3 equipado con un graficador Cole-Parmer 1202-0000 siguiendo la técnica de Kokkinakis y Brooks, (1979).

El medio de reacción consistió en 0.1 ml de 2,4 diclorofenol 1.2 mM; 0.1 ml $MnCl_2$ 400 μ M, ajustando para un volumen final de 1 ml en la celda del oxímetro con buffer de citratos 50 mM pH 4.2. Se agregó el extracto (0.1 mg prot.) y enseguida 40 μ l AIA 1mM y 40 μ l de H_2O_2 1% .La reacción fue evaluada siguiendo el consumo de O_2 .

Análisis estadístico

Para los resultados de enraizamiento por número de raíces, se práctico un ANOVA con una n= 5 y una prueba de diferencia de medias de Tukey (Reyes,1980) . Para la actividad de AIAox, se utilizaron estas mismas pruebas con una n=3.

Los resultados expresados como porcentaje de enraizamiento se obtuvieron de contar el número de esquejes enraizados en muestreos de 20 individuos cada uno, considerando el control como 100%.

RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo muestran que las condiciones para la síntesis de conjugados de auxinas aseguran un rendimiento elevado en sus productos. Asimismo las consideraciones bioquímicas sobre la mayor actividad de los derivados diseñados muestran que son adecuadas para la producción de derivados con alta capacidad de inducción de raíces adventicias. En este sentido los derivados obtenidos con ésteres activos registraron una mayor capacidad de enraizamiento en los ensayos realizados sobre especies de crisantemo y clavel.

En esta sección de resultados se presentan las constantes químicas y espectroscópicas que permitieron identificar a los derivados sintetizados. Adicionalmente se presentan los resultados de los bioensayos realizados con estos compuestos para el enraizamiento de las dos especies.

Caracterización espectroscópica de los conjugados

Indol-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 1)

Sintetizado de acuerdo al método general de Mollan *et. al*, 1972. Se realizó la síntesis del éster del AIA y el producto final fue recristalizado con éter isopropílico a baja temperatura. Para confirmar la identidad química de los cristales obtenidos se llevaron a cabo los análisis espectroscópicos de UV, IR en rango medio y espectro de masas. El indol-3-acetato de *p*-nitrofenilo se obtuvo con un rendimiento del 60%. Como se muestra en el Cuadro 1 el espectro de UV de este compuesto registra un máximo en 278 nm el cual corresponde al anillo bencénico fusionado con el pirrol (Figura 7). Asimismo en el Cuadro 1 se enlistan las vibraciones correspondientes al infrarrojo del compuesto, las asignaciones identificadas corresponden al producto de la esterificación (Figura 8), siendo el principal criterio de transformación química la aparición de una señal aguda en 1756 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster. Adicionalmente se observan vibraciones en la región de $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las señales de enlaces C-H saturados y aromáticos presentes en la molécula. Cabe mencionar que en el espectro se registra una señal aguda en 3411 cm^{-1} característico de fenoles, esta señal puede ser asociada a la presencia

de la materia prima del *p*-nitro fenol que no reaccionó cuantitativamente. Por otro lado también se registró el espectro de masas, a partir del termograma obtenido mediante la inserción directa del compuesto al analizador de masas.

En la Figura 9 se muestra el termograma de este derivado, donde se puede observar que el tiempo máximo de desorción del compuesto se registró a los 33 seg. También se observa en este termograma que la pureza del compuesto es alta, ya que no se registran otros picos de abundancia relativa de masa de intensidad significativa.

Finalmente el espectro de masas confirmó la presencia del compuesto esperado, ya que su patrón de fragmentación corresponde con las funcionalidades químicas del derivado. Como se puede observar en la Figura 10, el compuesto presenta un ión molecular de 296 m/z el cual corresponde con el peso molecular del compuesto esperado, asimismo presenta un pico base en 130 m/z que se produce con el rompimiento alfa de carbonilo, el cual está favorecido por su posición vinílica con respecto al anillo pirrólico, de ahí su abundancia relativa mayoritaria. Adicionalmente en el espectro se pueden observar fragmentaciones asociadas a la estructura química. Por ejemplo la pérdida del grupo nitro que está ubicado en posición *para* a la sustitución del éster fenólico, rindiendo un fragmento de 225 m/z. También se registran fragmentaciones con la pérdida del éster en su parte fenoxi para dar 158 y 174 m/z. cuando se arrastra al oxígeno y cuando no se arrastra respectivamente. El patrón de fragmentación completo de este compuesto se puede observar en la Figura 11.

Cuadro 1. Constantes espectroscópicas del indol-3-acetato de p-nitrofenilo (Derivado 1).

Peso Molecular: 298	GRUPO QUÍMICO:
UV	
280 nm	Fusión de benceno y pirrol
292 nm	Fusión de benceno y pirrol
IR	
3411 cm^{-1}	O-H
2933 cm^{-1}	C-H saturado
1756 cm^{-1}	Carbonilo del éster
MASAS	
296 m/z	Ión molecular
130 m/z	Pico base, ruptura alfa al carbonilo del éster
225 m/z	Pérdida del nitro con carbonos base de nitro
158 m/z	Ruptura del éster en la parte fenoxi
174 m/z	Ruptura del éster en la parte fenoxi

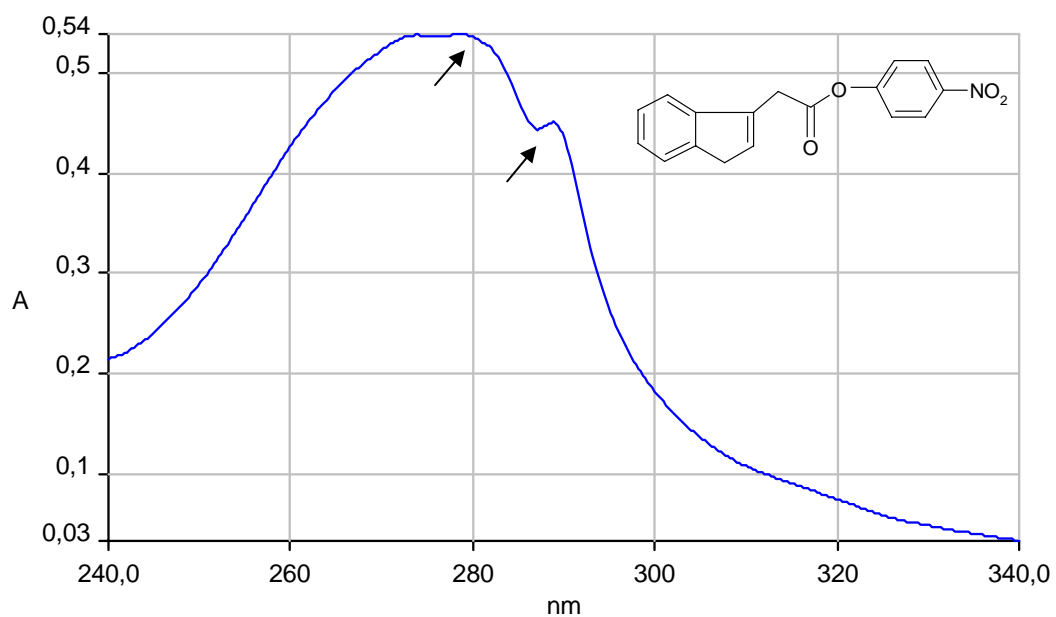


Figura 7. Espectro UV del Derivado 1. Se muestran los máximos de absorción a 280 y 292 nm.

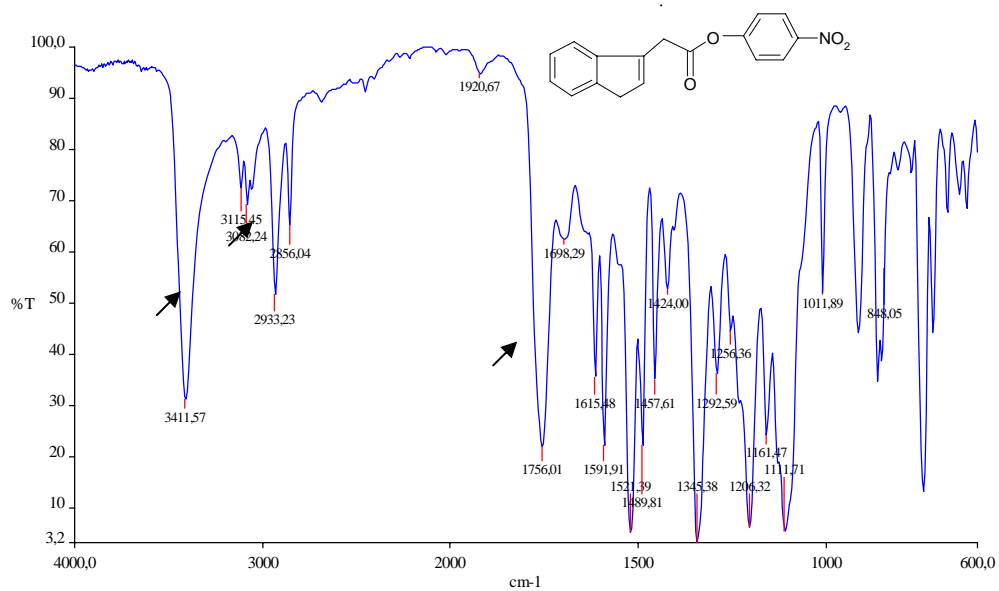


Figura 8. Espectro IR del Derivado 1. Las flechas muestran los picos fundamentales que evidencian la formación del derivado.

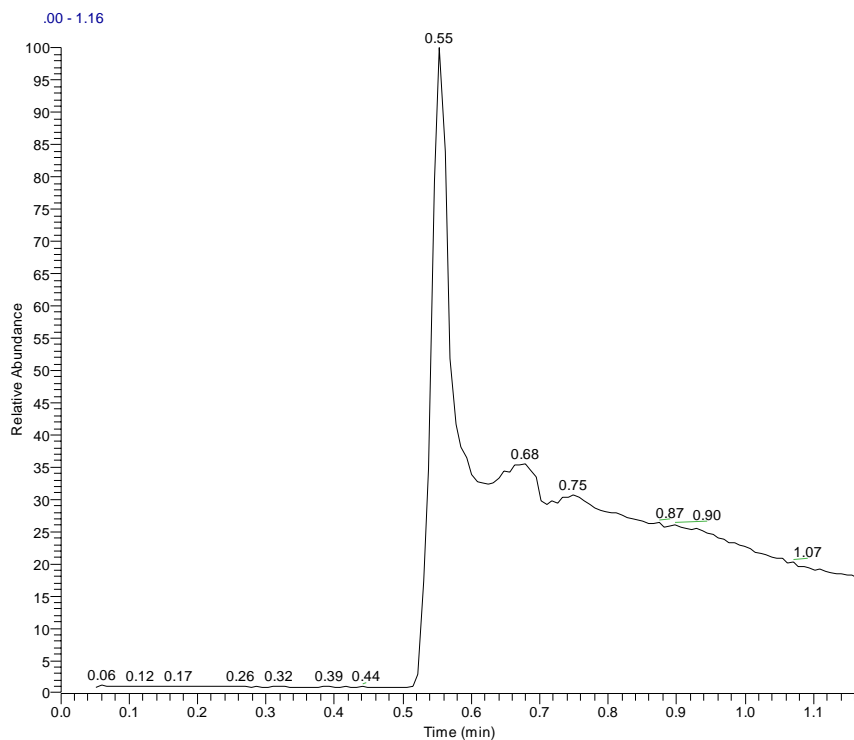


Figura 9. Termograma del Derivado 1. Muestra la presencia predominante de un solo compuesto.

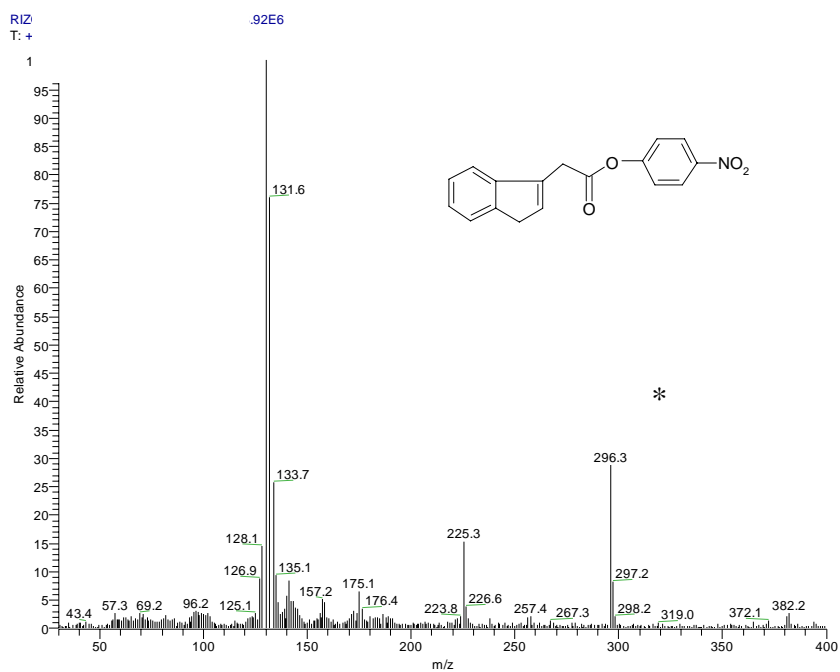


Figura 10. Espectro de masas del Derivado 1. Se muestra el ion molecular (*) y los fragmentos principales.

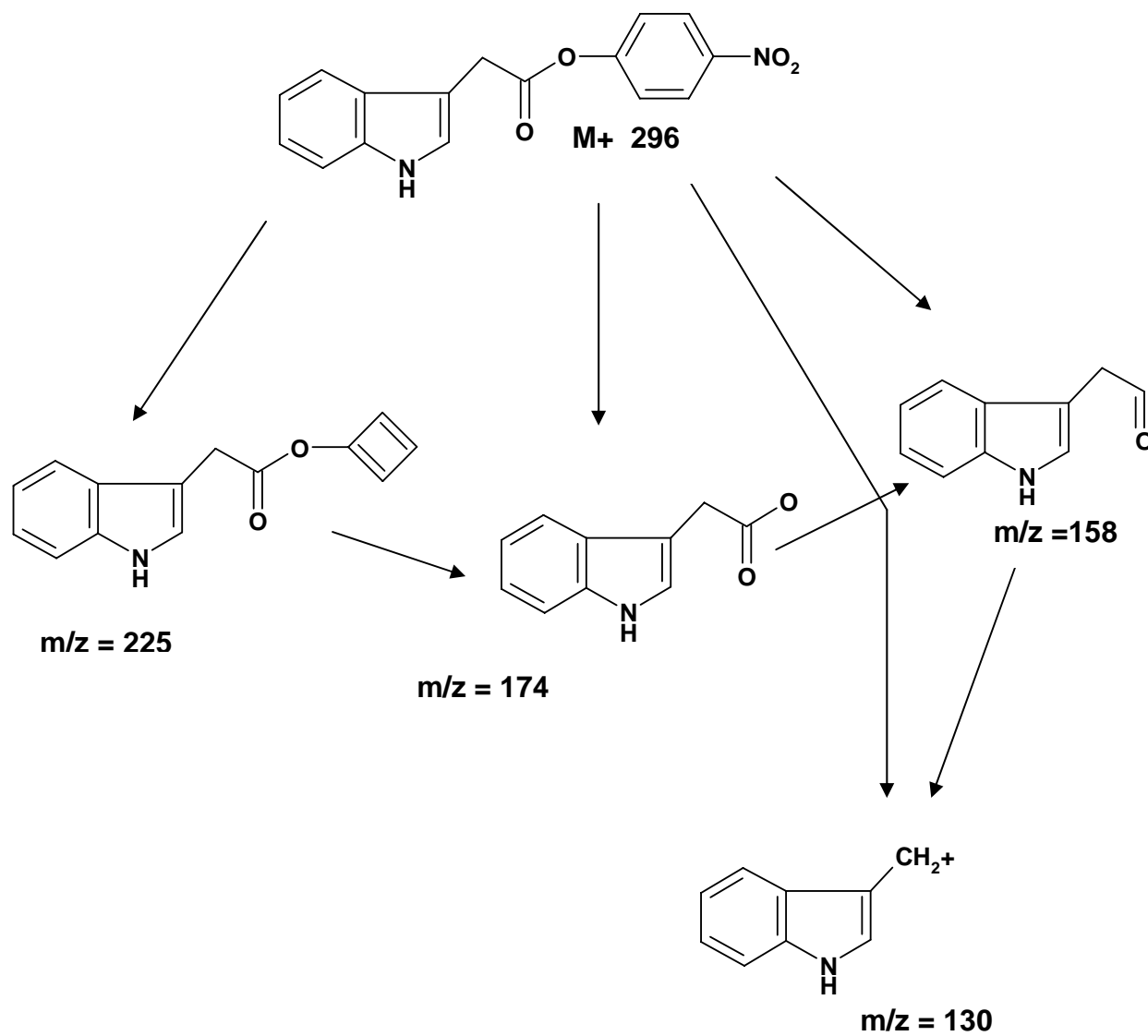


Figura 11. Patrón de fragmentación propuesto para el Derivado 1. Cada fórmula corresponde con una de las señales principales del espectro de masas.

Indol-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 2)

El rendimiento que se obtuvo fue de un 30 %. Cabe mencionar que este producto mostró un elevado carácter electrofílico, ya que se hidrolizaba rápidamente regenerando a sus precursores, por lo cual fue necesario llevar a cabo el registro de los espectros correspondientes inmediatamente después de haberlo sintetizado. En el cuadro 2 se presentan las constantes espectroscópicas que se obtuvieron a través de los espectros de UV, IR en rango medio y espectro de masas. Como se enlista en dicho cuadro, el espectro de UV de este compuesto registra un máximo en 240 nm asignado al anillo aromático del *p*-nitrofenil fosfato esterificado. En 270 y 282 nm, se observan dos cambios de pendiente del espectro correspondientes al anillo bencénico fusionado con el anillo pirrol. Adicionalmente se registro un máximo en 300 nm que se produce por la excitación de los electrones del anillo del nitrofenol al conjugarse con los electrones π de la hibridación sp^2 del fósforo (Figura 12).

Asimismo en el Cuadro 2 se enlistan las vibraciones correspondientes al infrarrojo del indol-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato, las asignaciones identificadas corresponden al producto de la esterificación (Figura 13), siendo el principal criterio de transformación química la aparición de una señal en 1747 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster. Adicionalmente, se observan vibraciones en la región de $2855\text{-}3057\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las señales de enlaces C-H saturados y aromáticos respectivamente. Cabe mencionar que en el espectro se registra una señal intensa en 3302 cm^{-1} característica de fenoles, esta señal puede ser asociada a la presencia de la materia prima del *p*-nitrofenil fosfato que no reaccionó cuantitativamente.

Por otro lado también se registró el espectro de masas, a partir del termograma obtenido mediante la inserción directa del compuesto al analizador de masas, en la figura 14 se muestra el termograma de este derivado, donde se puede observar que el tiempo máximo de desorción del compuesto se registró a los 34 segundos. También se observa en este termograma que la pureza del compuesto es alta, ya que no se registran otros picos de abundancia relativa de masa de intensidad significativa.

Finalmente el espectro de masas confirmó la presencia del compuesto esperado, ya que su patrón de fragmentación corresponde con las funcionalidades químicas

del derivado. Como se puede observar en la Figura 15, el compuesto presenta un ión molecular de 376 m/z, el cual corresponde con el peso molecular del compuesto esperado, asimismo presenta un pico base en 207 m/z que se produce con el rompimiento alfa de carbonilo, el cual esta favorecido por su posición vinílica con respecto al anillo pirrónico, de ahí su abundancia relativa mayoritaria. Adicionalmente en el espectro se pueden observar fragmentaciones asociadas a la estructura química. Por ejemplo la pérdida del grupo *p*-nitrofenoxi para producir el ión 256 m/z. Adicionalmente en este espectro se observa un ión correspondiente al grupo *p*-nitrofenilo fosfato, lo cual era de esperarse por su fuerte carácter electrofílico. El patrón de fragmentación completo de este compuesto se puede observar en la Figura 16.

Cuadro 2. Constantes espectroscópicas del indol-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 2)

Peso Molecular:	GRUPO QUIMICO:
UV	
240 nm	<i>p</i> -nitrofenol
300 nm	Nitrofenol conjugado con el fósforo
270, 282 nm	Benceno fusionado al pirrol
IR	
1747 cm ⁻¹	Carbonilo del éster
2855-3057 cm ⁻¹	C-H saturados aromáticos
MASAS	
376 m/z	Ión molecular
207 m/z	Pico base
256 m/z	Pérdida del <i>p</i> -nitrofenol

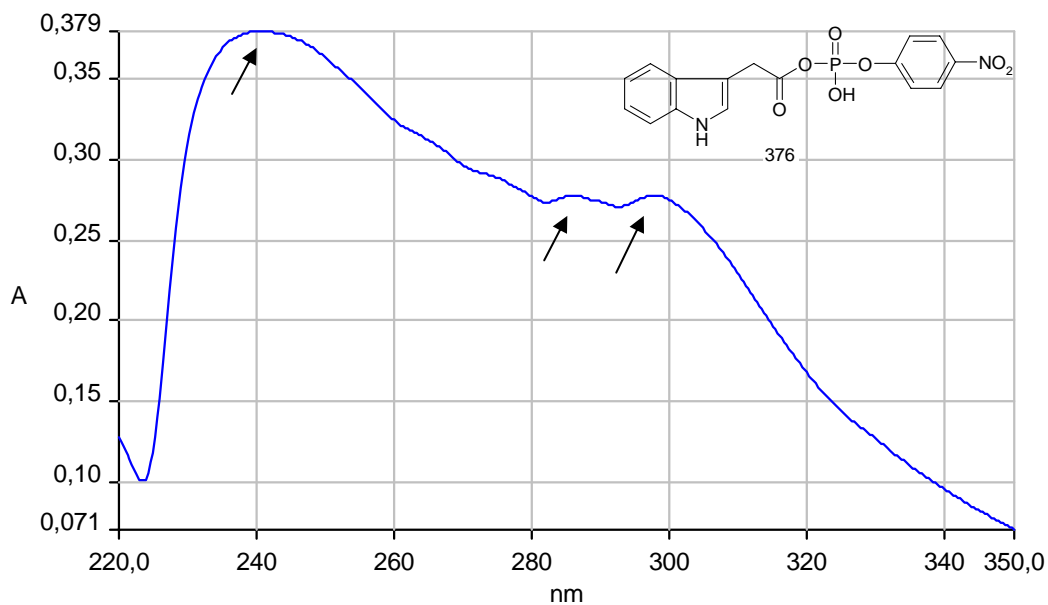


Figura 12. Espectro UV del Derivado 2. Se muestra los máximos absorción a 240, 300 y 282 nm.

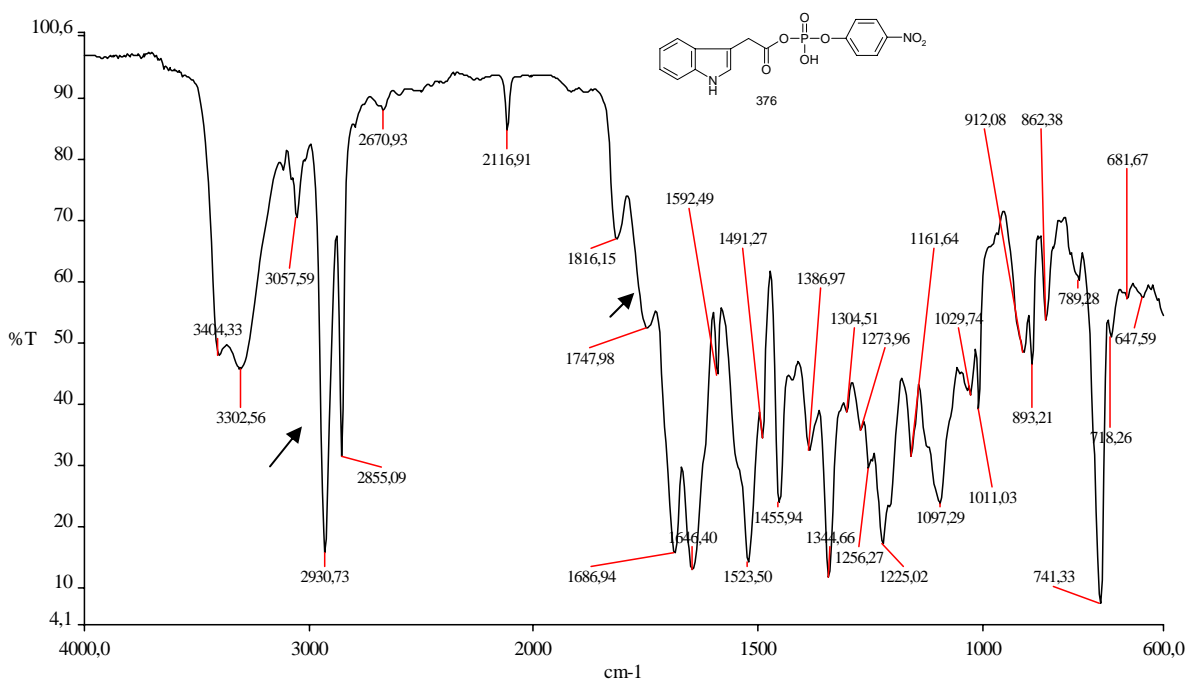


Figura. 13 Espectro IR del Derivado 2. Las flechas muestran los picos fundamentales que evidencian la formación del derivado.

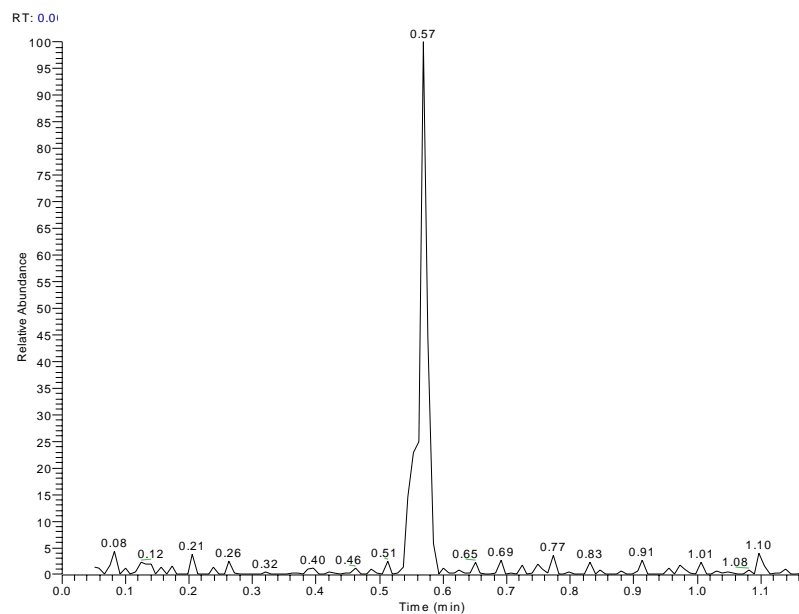


Figura 14. Termograma del Derivado 2. Muestra la presencia predominante de un solo compuesto.

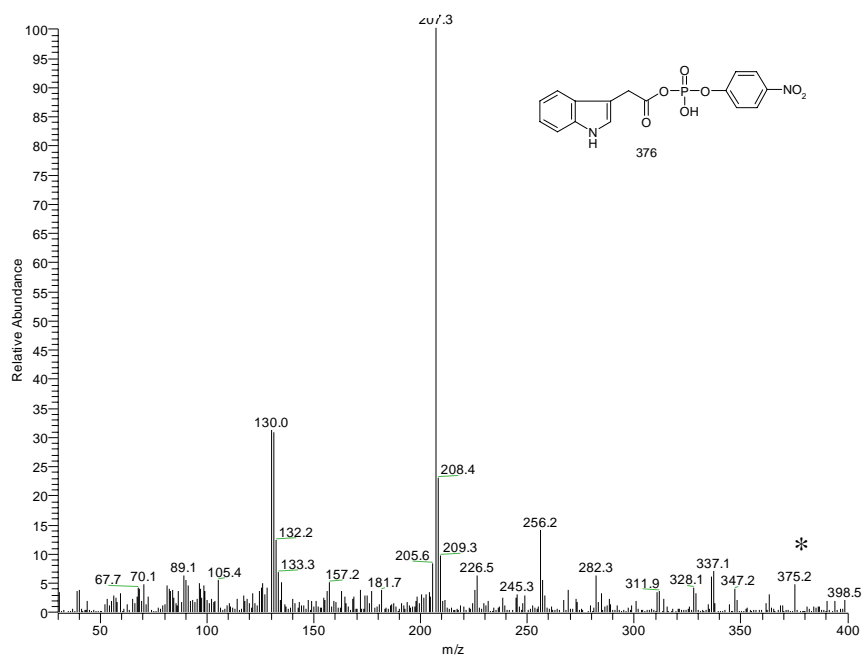


Figura 15. Espectro de masas del Derivado 2. Se muestra el ion molecular (*) y los fragmentos principales.

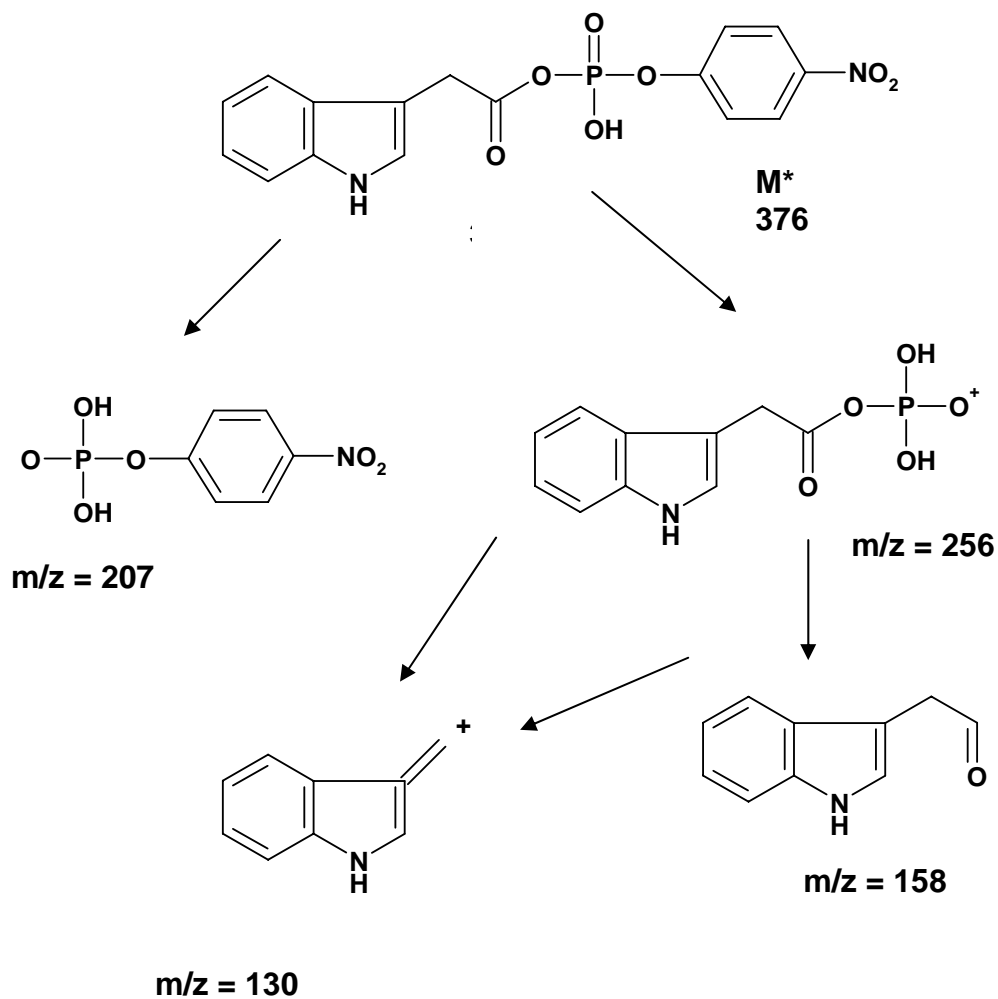


Figura 16. Patrón de fragmentación propuesto para el indol-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 2). Cada fórmula corresponde con una de las señales principales del espectro de masas.

Naftalenacetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 3)

Este compuesto fue sintetizado con la técnica de acoplamiento de ésteres con usando diciclohexilcarbodiimida como agente acoplante (Mollan *et. al*, 1972). El producto se recristalizó con acetato de etilo a baja temperatura. Cabe mencionar

que este producto es estable, ya que no se hidroliza espontáneamente. En el Cuadro 3 se presentan las constantes espectroscópicas que se obtuvieron a través de los espectros de UV, IR en rango medio y espectro de masas. El espectro de UV de este compuesto registra un máximo en 290 nm asignado a los dos anillos bencénicos fusionados del naftaleno. Asimismo se registra un máximo en 281 y en 265 nm correspondientes al benceno del *p*-nitrofenol y su conjugación con el carbonilo del éster respectivamente (Figura 17).

El espectro de infrarrojo de este compuesto se puede observar en la Figura 18, siendo el principal criterio de transformación química la aparición de una señal aguda en 1759 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster. Adicionalmente, se observan vibraciones en la región de $2856\text{-}3115\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las señales de enlaces C-H saturados y aromáticos respectivamente. Cabe señalar que el espectro de infrarrojo muestra señales de enlace O-H, probablemente pertenecientes al precursor *p*-nitrofenol.

Por otro lado también se registró el espectro de masas, a partir del termograma obtenido mediante la inserción directa del compuesto al analizador de masas, en la Figura 19 se muestra el termograma de este derivado, donde se puede observar dos picos de desorción en 35 y 45 seg. La presencia de estos dos picos puede ser explicada por la alta temperatura de evaporación del compuesto debido a su elevado peso molecular.

Finalmente el espectro de masas confirmó la presencia del compuesto esperado, ya que su patrón de fragmentación corresponde con las funcionalidades químicas. Como se puede observar en la Figura 20, el compuesto presenta un ión molecular de 307 m/z el cual corresponde con el peso molecular del compuesto esperado, asimismo presenta un pico base en 141 m/z que se produce con el rompimiento alfa de carbonilo, el cual está favorecido por su posición vinílica con respecto al anillo naftalénico, de ahí su abundancia relativa mayoritaria. Adicionalmente en el espectro se pueden observar fragmentaciones asociadas a la estructura química. Por ejemplo la pérdida del grupo *p*-nitrofenoxi para producir el ión 168 y 185 m/z . asociados a las fragmentaciones en las posiciones alfa y beta del carbonilo del éster del lado alcoxi. El patrón de fragmentación completo de este compuesto se puede observar en la Figura 21.

Cuadro 3. Constantes espectroscópicas del naftalenacetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 3).

Peso Molecular:	GRUPO QUIMICO:
UV	
290 nm	Anillos bencénicos fusionados
281 nm	Benceno <i>p</i> -nitrofenol
265 nm	Benceno, nitrofenol conjugado
IR	
1759 cm ⁻¹	Carbonilo del éster
2856-3115 cm ⁻¹	C-H saturados aromáticos
MASAS	
307 m/z	Ión molecular
141 m/z	Pico base
168 m/z	Pérdida del alcoxi en alfa
185 m/z	Pérdida del alcoxi en beta.

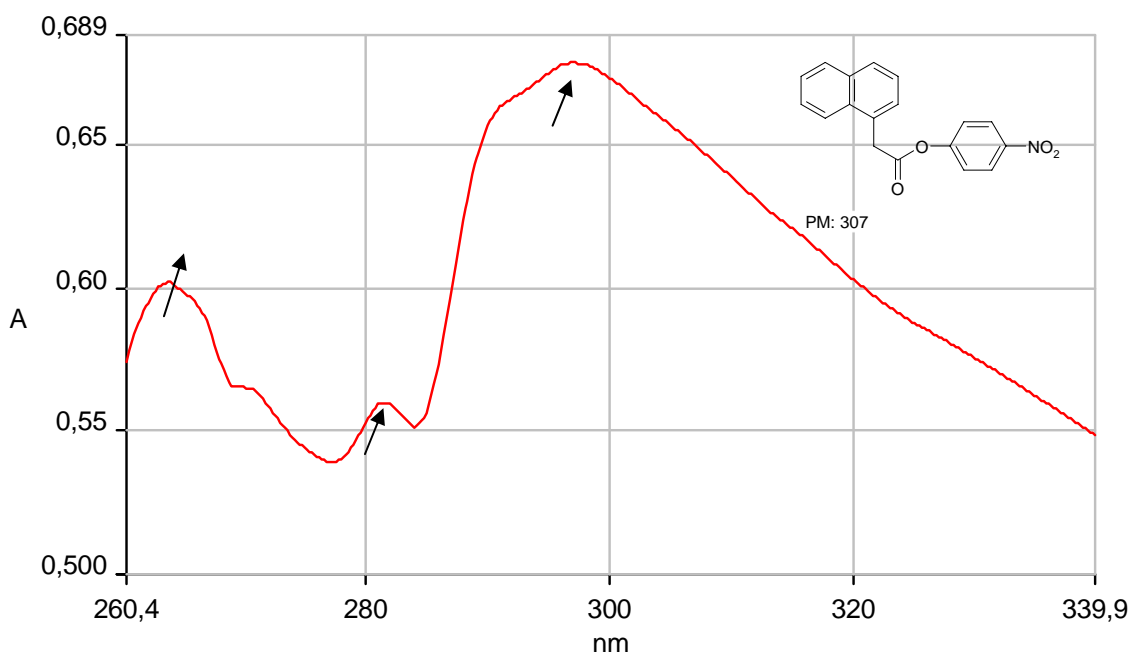


Figura 17. Espectro UV del Derivado 3. Se muestran los máximos a 265, 281 y 290.

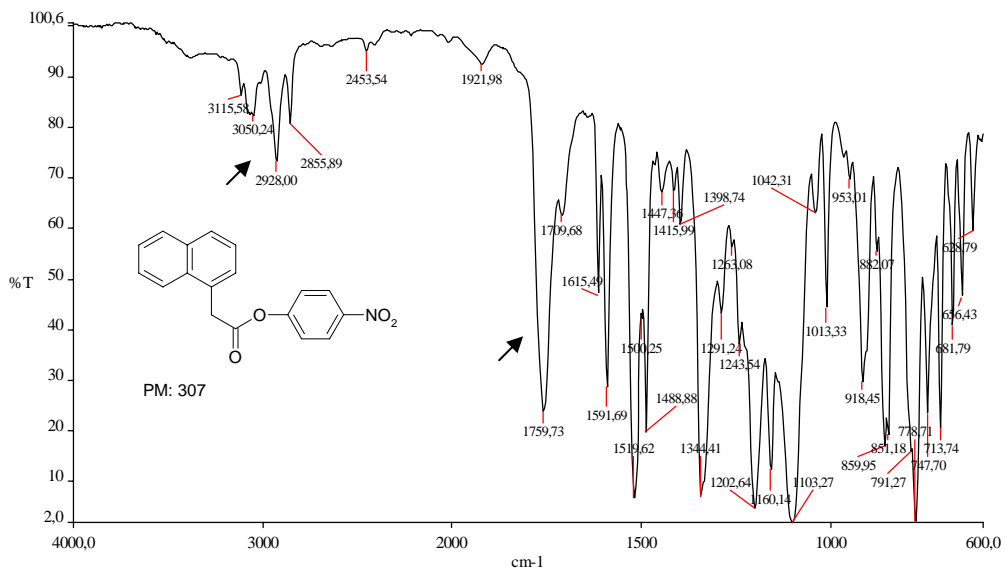


Figura 18. Espectro de IR del Derivado 3. Las flechas muestran los picos fundamentales que evidencian la formación del derivado.

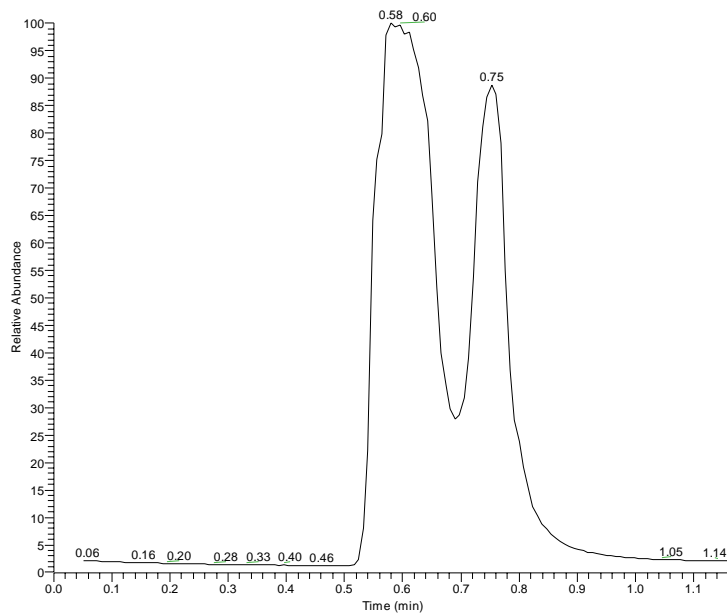


Figura 19. Termograma del derivado 3. Muestra la presencia de 2 entidades

RIZOCAB02_050422193004 #62 RT: 0.54 AV: 1 NL: 1.05E6
T: + e Full ms [30.00-400.00]

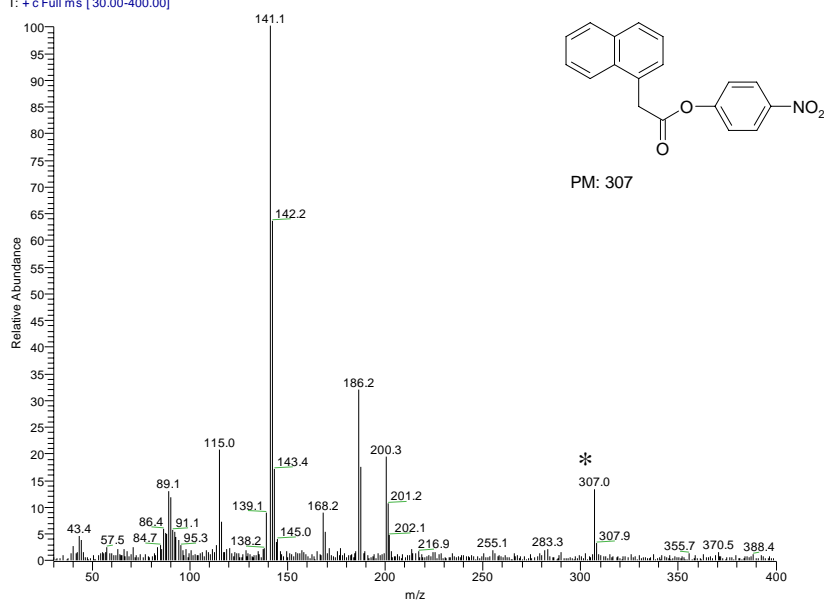


Figura 20. Espectro de masas del Derivado 3. Se muestra el ión molecular (*) y los fragmentos principales.

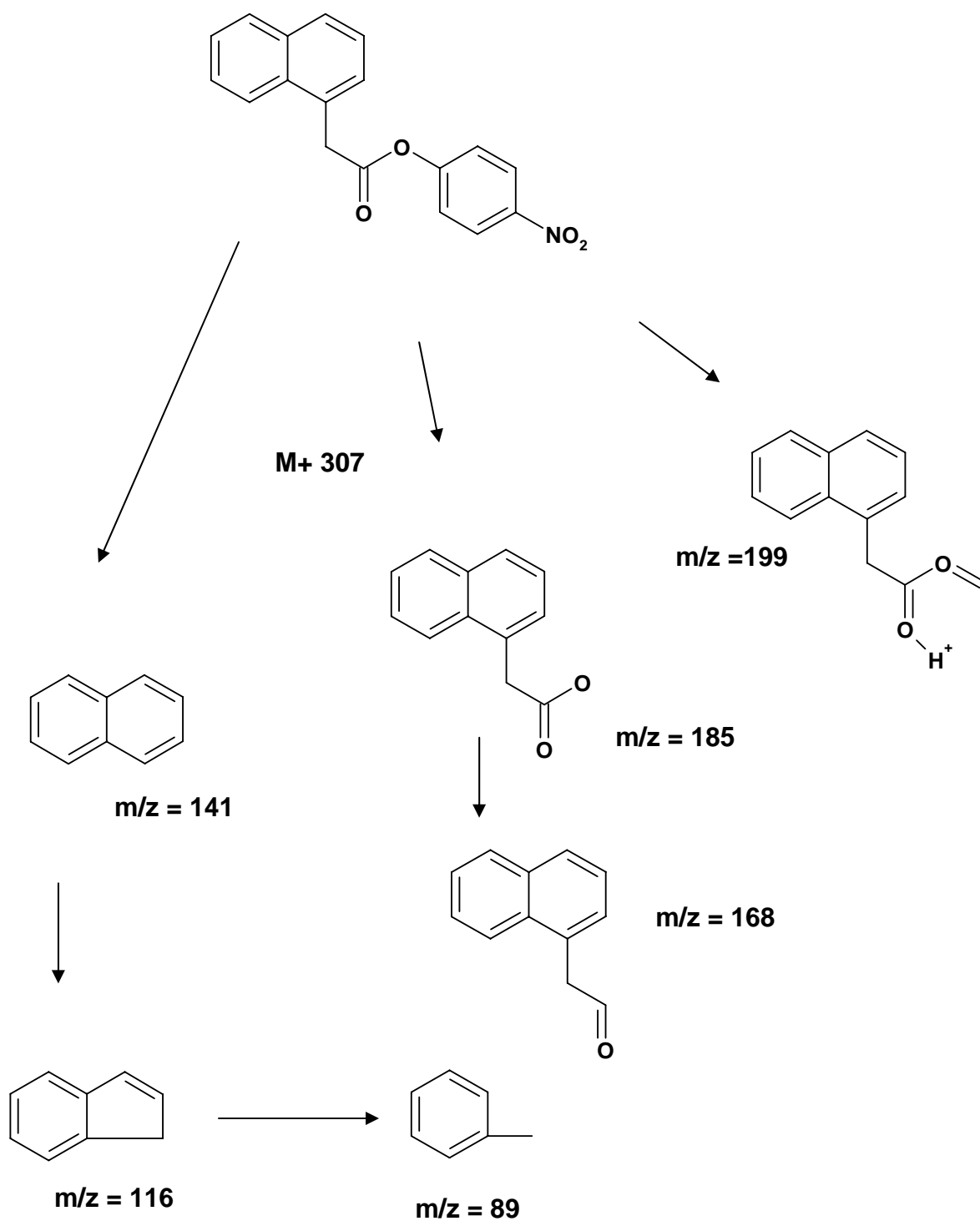


Figura 21. Patrón de fragmentación propuesto para el naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 3). Cada fórmula corresponde con una de las señales principales del espectro de masas.

Naftalen-3-acetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 4)

Cabe mencionar que este producto es poco estable, ya que se hidroliza espontáneamente regenerando los precursores. En el Cuadro 4 se presentan las constantes espectroscópicas que se obtuvieron a través de los espectros de UV, IR en rango medio y espectro de masas. El espectro de UV de este compuesto registra un máximo en 298 nm asignado a los dos anillos bencénicos fusionados del naftaleno. Asimismo se registra un máximo en 240 nm correspondientes al benceno del *p*-nitrofenol (Figura 22).

Asimismo en la Cuadro 4 se enlistan las vibraciones correspondientes al infrarrojo de este compuesto. Las asignaciones identificadas corresponden al producto de la esterificación (Figura 23), siendo el principal criterio de transformación química la aparición de una señal aguda en 1706 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster. Adicionalmente, se observan vibraciones en la región de $2855\text{-}3048\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las señales de enlaces C-H saturados y aromáticos respectivamente. Cabe señalar que el espectro de infrarrojo no muestra señales al enlace O-H del ácido ni del fenol, con lo cual se establece que la reacción se llevó a cabo cuantitativamente.

Como se puede observar en la figura 25, el compuesto presenta un ión molecular de 387 m/z, el cual corresponde con el peso molecular del compuesto esperado, asimismo presenta un pico base en 142 m/z que se produce con el rompimiento alfa de carbonilo el cual esta favorecido por su posición vinílica con respecto al anillo naftalénico, de ahí su abundancia relativa mayoritaria. Adicionalmente en el espectro se pueden observar fragmentaciones asociadas a la estructura química. Por ejemplo la pérdida del grupo *p*-nitrofenoxi para producir el ión 267 m/z. Asimismo, se observan las fragmentaciones en las posiciones alfa y beta del carbonilo del éster del lado alcoxi para rendir los iones 169 y 185 m/z respectivamente. El patrón de fragmentación completo de este compuesto se puede observar en la figura 26.

Cuadro 4. Constantes espectroscópicas del naftalenacetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 4).

Peso Molecular	Grupo químico
UV	
298 nm	Naftaleno
240 nm	<i>p</i> -nitrofenol
IR	
1706 cm ⁻¹	Carbonilo del éster
2856-3048 cm ⁻¹	C-H saturados aromáticos
MASAS	
387 m/z	ión molecular
142 m/z	Pico base
169 m/z	Ruptura carbonilo alfa
183	Ruptura carbonilo en beta

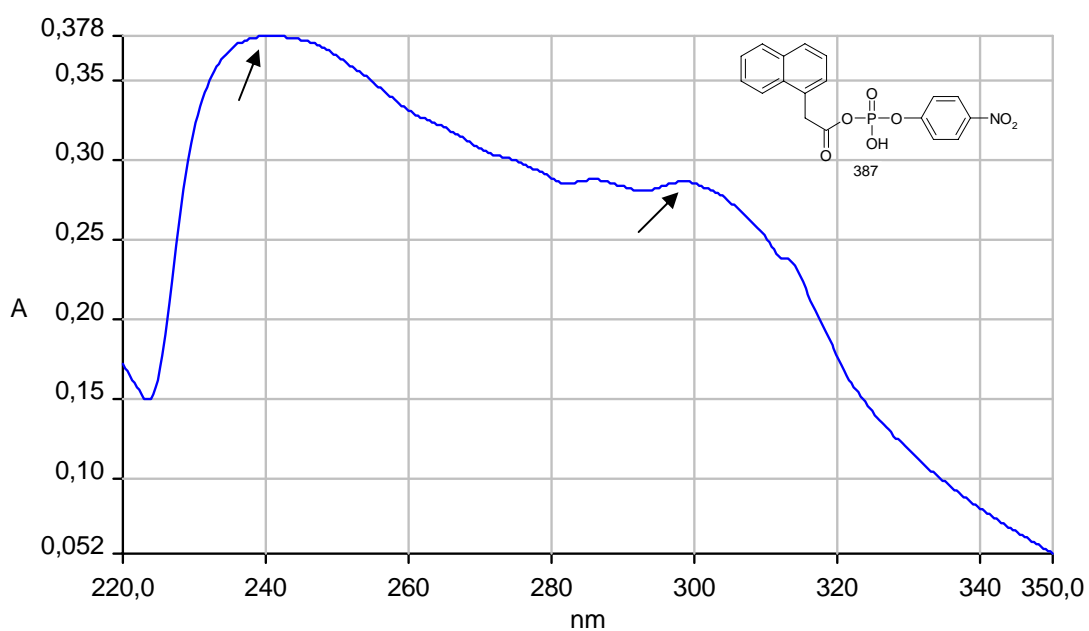


Figura 22. Espectro UV del Derivado 4. Se muestran los máximos de absorbancia 240 y 298 nm.

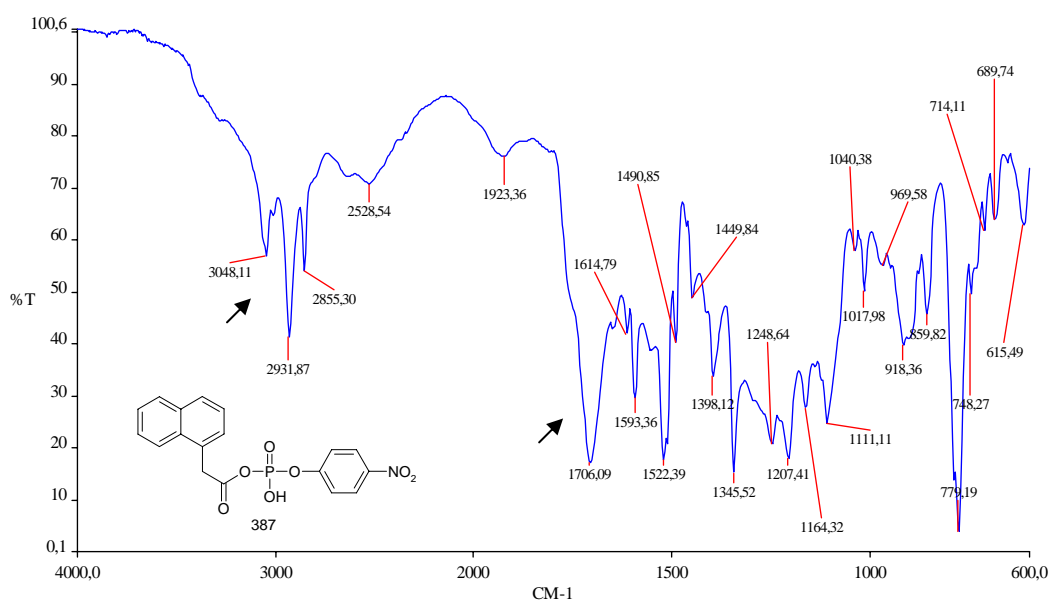


Figura 23. Espectro IR del Derivado 4. Las flechas muestran los picos fundamentales que evidencian la formación del derivado.

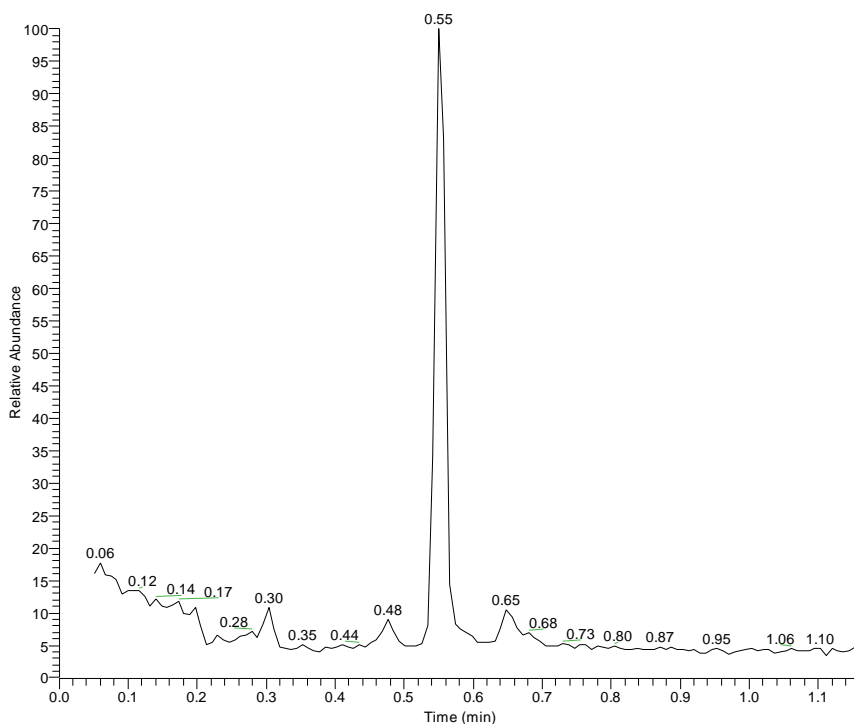


Figura 24. Termograma del Derivado 4. Muestra la presencia predominante de un solo compuesto.

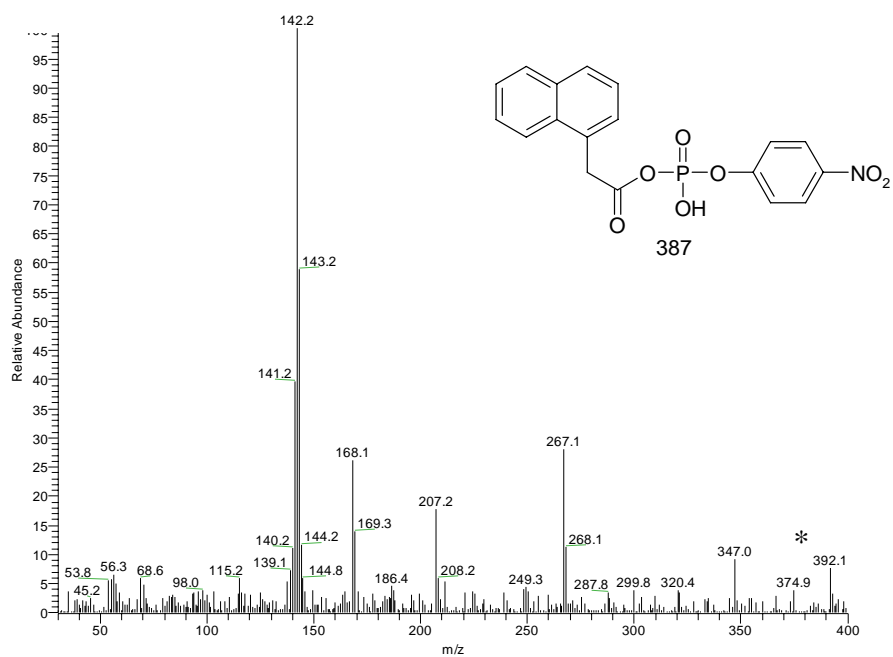


Figura 25. Espectro de masas del Derivado 4 Se muestra el ión molecular (*) y los fragmentos principales.

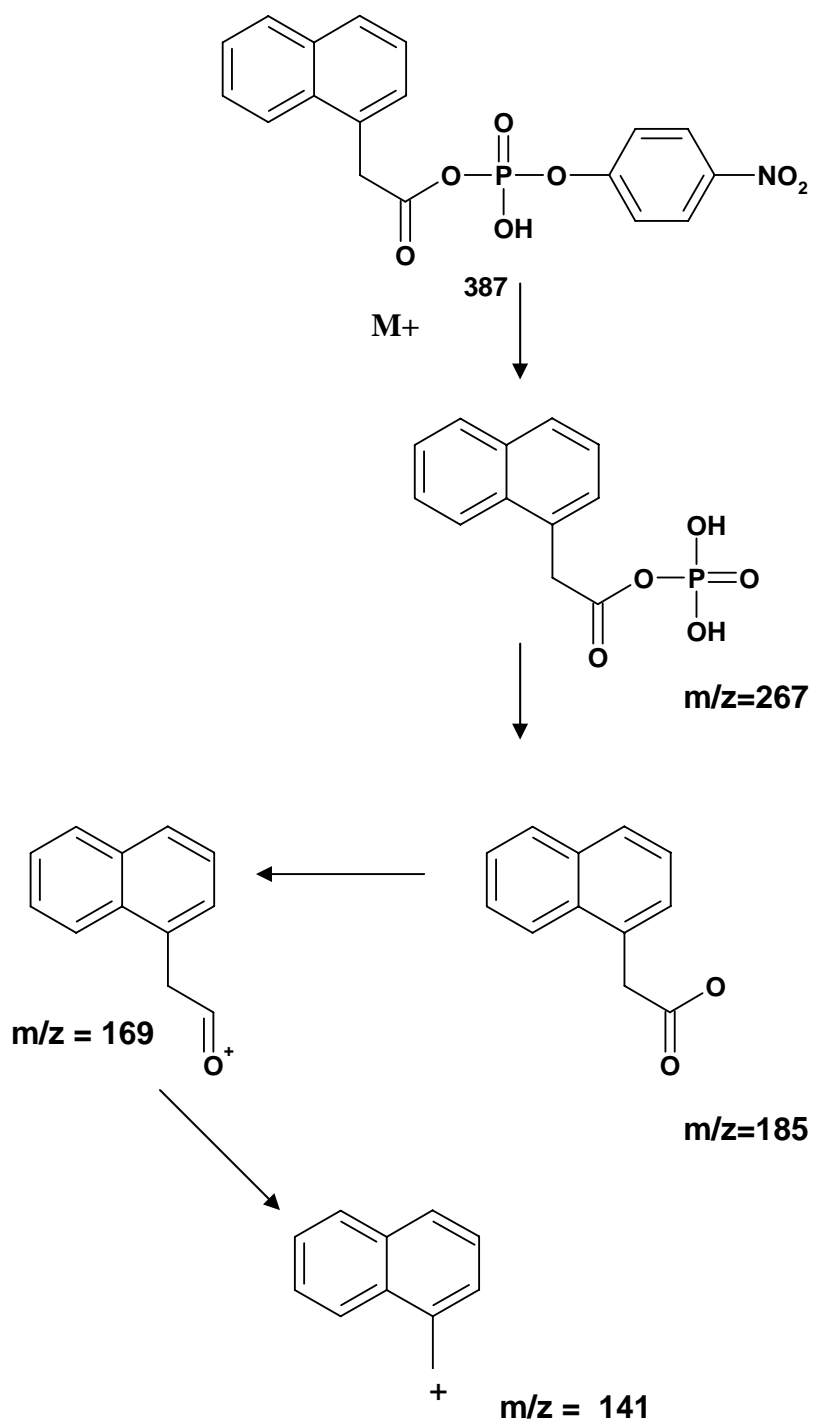


Figura 26. Patrón de fragmentación de masa propuesto para el naftalenacetato de *p*-nitrofenilfosfato (Derivado 4). Cada fórmula corresponde con una de las señales principales del espectro de masas.

Bioensayo con crisantemo (var. Polar)

Los resultados muestran que la administración del Derivado 1 provocó un aumento 150% más de esquejes enraizados con respecto del control, mientras que el producto comercial RADIX produjo un incremento de 100 % (Figura 27). Se registró también el número de raíces producidas por esqueje (Figura 28), con el fin de valorar si se encontraban diferencias en el tiempo de surgimiento de las raíces o en la cantidad de ellas entre los tratamientos. Los resultados muestran una diferencia significativa entre el control y el tratamiento con el Derivado 1, mientras que el RADIX no produjo un incremento significativo. Adicionalmente, se puede observar en la figura 28 que los datos muestran desviaciones importantes, por lo que para los ensayos subsecuentes con clavel sólo se registraron los datos de porcentaje de esquejes enraizados.

Los registros de actividad en extracto crudo de la peroxidasa AIA oxidasa muestran en general un descenso de actividad conforme avanza el tiempo de enraizamiento de los esquejes, lo cual es un comportamiento esperado en función de la activación inicial de las peroxidasas involucradas en las primeras etapas del proceso, las cuales disminuyen su actividad una vez formadas las raíces. Así mismo, se puede observar que en el día 5 de tratamiento el extracto con mayor actividad de la enzima fue el obtenido del tratamiento con el RADIX, registrado una velocidad de 150 nmoles de O₂, en contraste, los tratamientos Control y Derivado 1 registran en el mismo día de muestro una menor velocidad cercana a los 85 nmoles de O₂, cabe mencionar que en este día de tratamiento las muestras de Control y Derivado 1 son diferentes significativamente ($\alpha = 0.05$) con respecto del Radix. Los resultados descritos pueden ser discutidos en función de dos factores posibles, el primero de ellos relacionado a la menor inducción de raíces que promueve el Control, con lo cual, el nivel endógeno de peroxidasas es menor, así como su actividad. Por otro lado, el segundo factor puede referirse a la mayor inducción de enraizamiento en el tratamiento RADIX y Derivado 1, en los cuales, el Derivado 1 muestra la menor actividad debido a la menor afinidad de la enzima por el sustrato sintético (Fig 29).

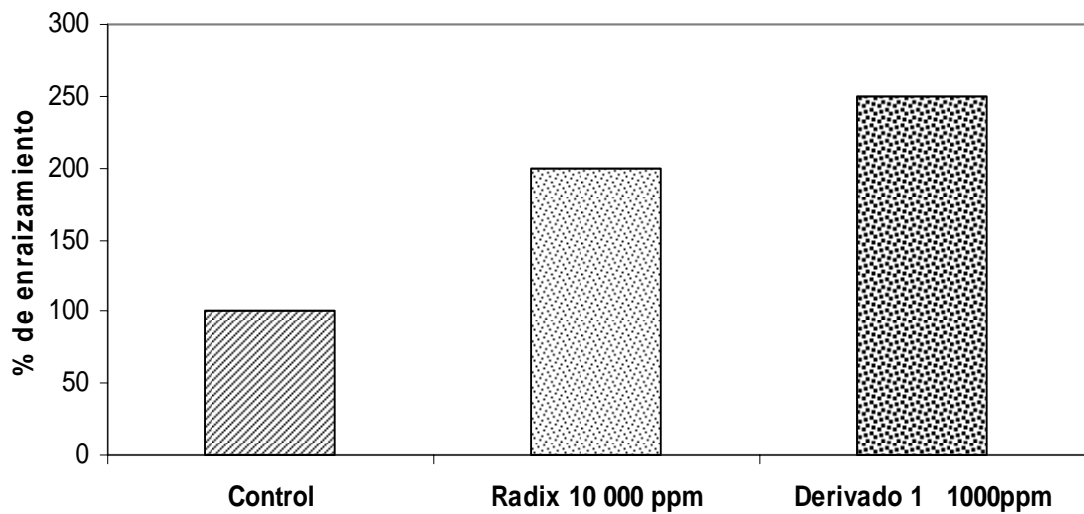


Figura 27. Enraizamiento en Crisantemo (var. Polar) expresado como porcentaje considerando el control como 100% (n=5). El Radix se aplicó en formulación comercial de 10,000 ppm y el Derivado 1 a 1000 ppm, de acuerdo al trabajo previo de Vergara *et al.*, (1997).

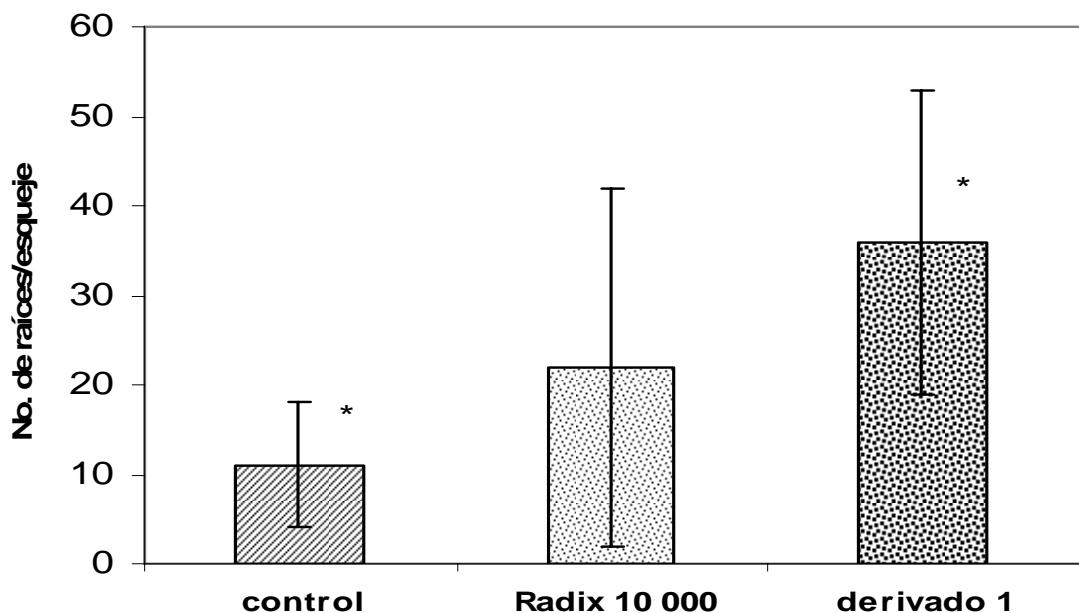


Figura 28. Enraizamiento en Crisantemo (var. Polar) expresado como el promedio del número de raíces por esqueje +/- DS (n=5). (*) indica diferencias significativas ($\alpha=.05$).

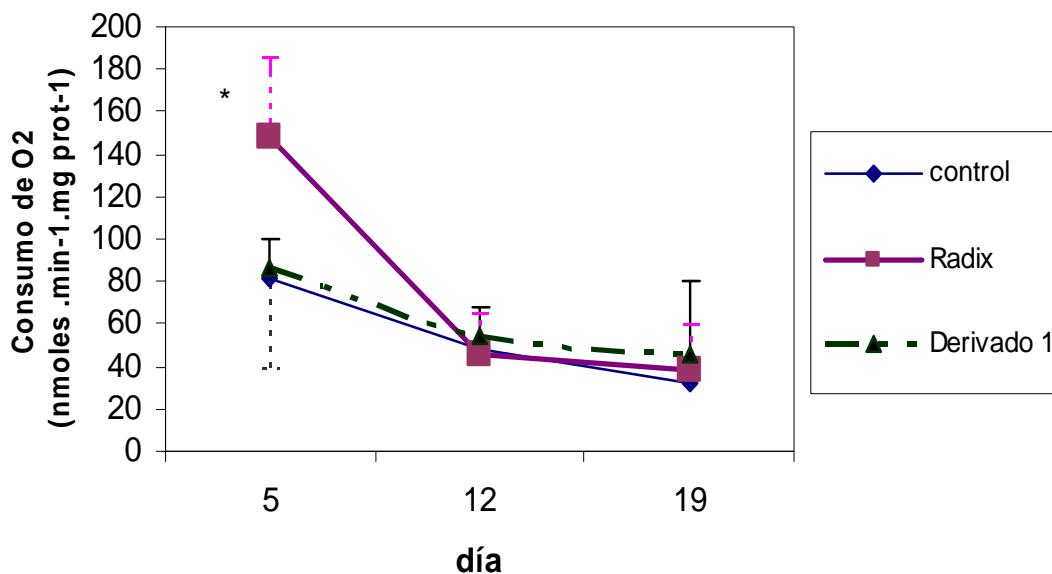


Figura 29. Actividad de AIAox durante el enraizamiento de crisantemo var. Polar. Resultados del promedio de 3 experimentos independientes +/- DS. (*) indica diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

Bioensayo con clavel (var. América)

A partir de los resultados obtenidos en crisantemo con el Derivado 1, se procedió a evaluar los derivados fosforilados a una concentración de 100 ppm, la cual fue definida a partir de curvas de dosis-respuesta obtenida en ensayos preliminares con esquejes de frijol mungo y clavel (datos no mostrados). En las condiciones descritas se evaluaron los derivados 1, 2, 3, y 4 en esquejes de clavel.

La Figura 30 muestra que todos los derivados incrementaron el porcentaje de esquejes enraizados respecto del control, siendo los derivados 1 y 2 los que presentaron el porcentaje más alto con 100 y 66% respectivamente.

Los registros de actividad en extracto crudo de la AIAox de clavel muestran un comportamiento similar al observado en crisantemo, donde el tratamiento que registra la mayor actividad es el RADIX, en tanto que el Control y Derivado 1, registran tasas menores y similares entre sí, cabe mencionar que en el registro del día 5 estos tratamientos presentan diferencias significativas. En este mismo sentido, se observa un efecto de la modificación química de las auxinas en la formación de raíces y la actividad de las enzimas relacionadas, sugiriendo que la condición en la cual, la menor actividad de la enzima se asocia con la mayor

inducción rizogénica, puede estar vinculada a una menor afinidad de las peroxidasa por los conjugados sintéticos adicionados.

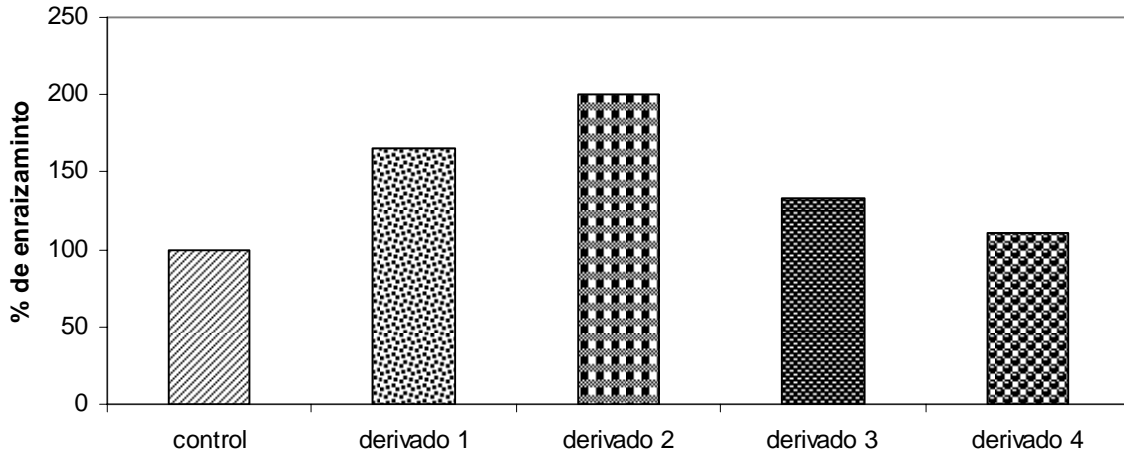


Figura 30. Enraizamiento en Clavel (var. América). Expresado como porcentaje considerando como 100% el control a los 30 días de aplicado los tratamientos. Todos los compuestos auxínicos se aplicaron a 100 ppm, que en ensayos previos mostraron los mejores efectos de enraizamiento

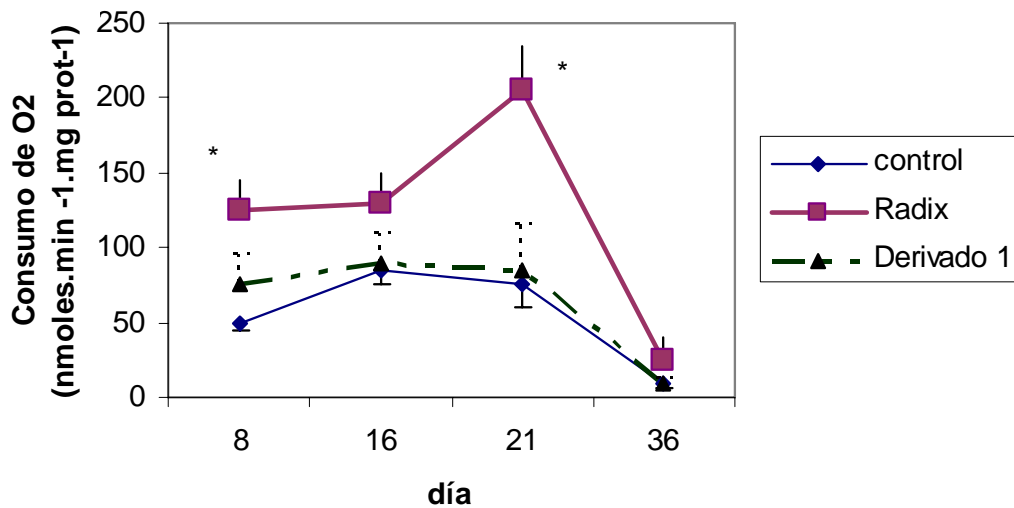


Figura 31. Actividad de AIAox durante el enraizamiento de clavel var. América. Resultados del promedio de 3 experimentos independientes +/- DS. (*) indica diferencias significativas entre Radix y los otros dos tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Ensayo de actividad de AIAox purificada

La fig. 32 muestra la actividad de AIAox purificada de clavel y crisantemo, usando 3 sustratos: AIA y AIB comerciales y el Derivado 1. Es importante destacar como la modificación química del Derivado permite eludir la acción oxidativa de la enzima AIAox., lo que refuerza la hipótesis de que la conjugación es un mecanismo para mantener un reservorio de auxina disponible, según los requerimientos fisiológicos en la planta.

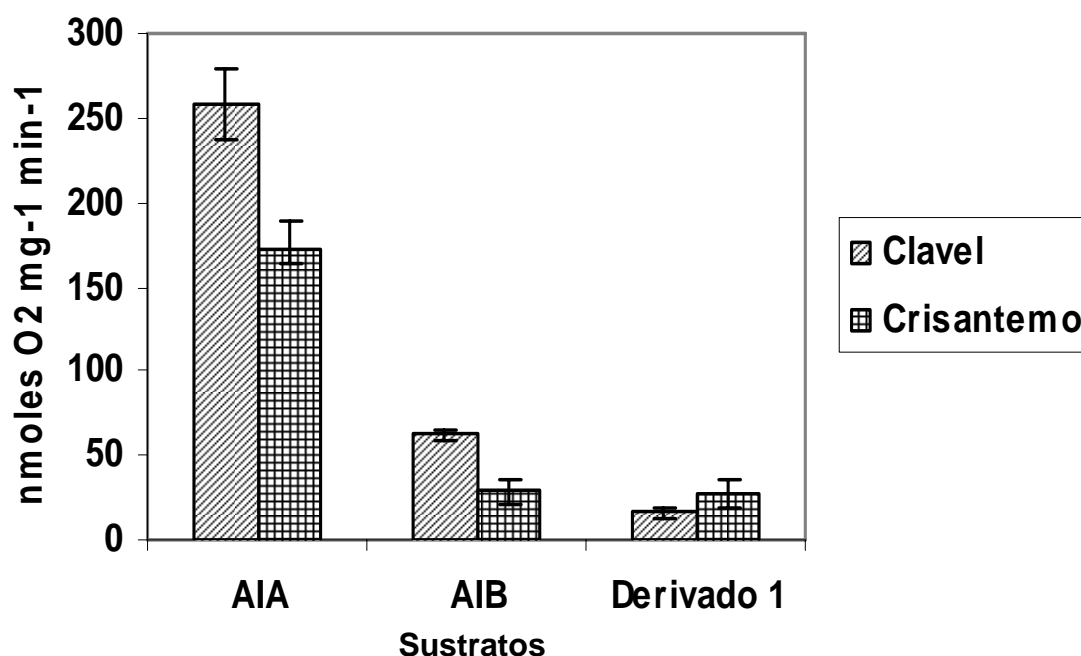


Figura 32. Actividad de AIAox purificada. Se aisló y purificó a partir de extractos de la base esquejes de clavel (var. América) y crisantemo (var. Polar) crecidos en presencia del Derivado 1 100ppm. Las barras representan el promedio de 3 replicas +/- DS. Existen diferencias significativas entre especies y entre sustratos con excepción de AIB y Derivado 1 en crisantemo ($\alpha = 0.05$).

DISCUSIÓN

Síntesis química de los derivados

La caracterización espectroscópica descrita en la sección de resultados, proporciona elementos suficientes para establecer la identidad química de cada derivado. Especialmente los espectros de masas de los derivados (Derivado 1: $m/z=296,130,225,158,178$; Derivado 2: $m/z=376,130,256,202$; Derivado 3: $m/z=307,141,168,185$ y Derivado 4: $m/z=387,141,169,183$) y sus respectivos patrones de fragmentación, constituyen una clara evidencia que los compuestos aplicados en este trabajo coinciden con la estructura química buscada. Existe una gama muy amplia de trabajos donde se han utilizado conjugados auxínicos para rizogénesis adventicia (Bialek *et al.*, 1983; Wiesman *et al.*, 1989), pero han utilizado derivados glucosídicos o aminoácidos de AIA o AIB. En este sentido, Napoli *et al.*, (1993) probaron conjugados de N- ϵ -(indol-3-acetil)-L-Lisina que estimularon la rizogénesis pero en menor grado que el AIA. Por otro lado, Balázs *et al.*, (1995) probaron una estrategia sintética de dos pasos para obtener conjugados de auxina esterificados con colina, que promovieron la elongación de tallos de chícharo a concentraciones de 1 μM , con rendimientos de 40-60%.

Es necesario destacar que aunque la reacción de esterificación de Mollan y col. (1972) es un método muy común en la síntesis química, al momento de la revisión bibliográfica no se encontró ningún otro reporte donde se hayan sintetizado o utilizado los conjugados descritos en esta tesis.

Para el derivado 2, incluso se buscó en bases de datos de patentes nacionales e internacionales sin encontrar ningún reporte. Los derivados 1 y 3 se obtuvieron con buenos rendimientos (60% y 50%) y muestran estabilidad química. En algunos bioensayos, los derivados fosforilados 2 y 4 mostraron incremento en la rizogénesis de clavel pero parecen tener menor estabilidad debido a la gran reactividad del grupo fosfato. Sin embargo, debido precisamente a esta propiedad sería de utilidad probar estos dos derivados en otro estudio más amplio pues una vez absorbidos e introducidos al interior celular rápidamente pueden formar otros conjugados o hidrolizarse para liberar la auxina. Tartoura *et al.*, (2004) muestran resultados donde se aprecia claramente como los niveles endógenos de AIA disminuyen

gradualmente después de un pico a las 6 h y el correspondiente aumento de conjugados de las 6 a las 48 h siguientes, en esquejes de frijol mungo. Algunos conjugados de AIA (AIA-Ala, AIA-Leu y AIA-glucosa) pueden ser hidrolizados de nuevo a AIA y ser activos en los bioensayos, mientras que otros marcados para degradación (AIA-Asp y AIA-Glu) no muestran actividades auxínicas (Ljung *et al.* 2002). En *Arabidopsis* se ha detectado a la presencia de metiléster de AIA que puede ser hidrolizado por una esterasa para dar AIA libre activo (Li, *et al.* 2007; Qin *et al.*, 2005).

Es necesario mencionar aquí que pueden realizarse otros estudios que analicen más profundamente la absorción y solubilidad de los cuatro derivados.

Bioensayo con crisantemo.

Se han encontrado muchos productos naturales que tienen efecto auxínico. El ácido indolacético (AIA), 4-Cloroindolacético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético son ejemplos comunes (Woodward. y Bartel, 2005). Precursores del AIA, como el indol-3-acetonitrilo y el indol-3-pirúvico, también muestran actividad en los bioensayos, presumiblemente porque se convierten en AIA en los tejidos blanco. La actividad del AIA es modulada a tres diferentes niveles independientes: homeostasis, transporte polar y respuestas auxínicas. La homeostasis incluye la biosíntesis de novo de AIA, su degradación y su conjugación y deconjugación con azúcares o aminoácidos (Bartel *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001, 2002; Cohen *et al.*, 2003). El AIA libre constituye el 1% y es el responsable de la actividad. El resto existe como ésteres o amidas para almacenaje o degradación (Ljung *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* se ha detectado la presencia de metiléster de AIA que puede ser hidrolizado por una esterasa para dar AIA libre activo (Li *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2005).

Dado que este es el primer trabajo con estos derivados, no es posible contrastar los resultados con trabajos previos, y los trabajos que hay con crisantemo con auxinas usan AIA, ANA o AIB y no conjugados, además de que algunos son a nivel de cultivo *in vitro* (Teixeira, 2003), lo que dificulta la comparación. Sin embargo, Wiesman *et al.*, (1989) reportan un valor de 57 raíces por esqueje de frijol mungo

contra 8 del control, usando indol-3-butirilaspártico 100 μM , lo que podría indicar que la conjugación es un medio promotor de enraizamiento en las especies evaluadas. Adicionalmente, se ha demostrado que la aplicación exógena de AIA-Ala, AIA-Gly y AIA-Phe puede reemplazar el efecto de AIA en *Arabidopsis* (Cohen y Bandurski, 1982).

Para interpretar y discutir los resultados de rizogénesis obtenidos en este debe considerarse que la formación de raíces tiene 3 fases distintas: la inducción, donde ocurren cambios bioquímicos y moleculares previos a cualquier evento celular, la iniciación, donde ocurren las primeras modificaciones anatómicas y la protrusión, correspondiente a la emergencia del primordio radicular (Gaspar *et al.* 1992, Vatulescu *et al.*, 2004). En varias especies analizadas, la actividad de AIA oxidasa muestra un incremento gradual en las fases de inducción, alcanzando un máximo justo antes de la iniciación y un descenso marcado una vez empezada la protrusión. El proceso de enraizamiento involucra una serie de cambios con variaciones en la concentración de AIA y la actividad peroxidasa (Hausman, 1993; Moncousin, 1998), donde la concentración de auxina y la actividad de AIA oxidasa muestran una correlación inversa (Gaspar *et al.*, 1992; Ripetti, 1994; Gendreau *et al.*, 1997). Esto ha llevado a considerar que la evaluación de la actividad de AIA oxidasa puede constituir un marcador para predecir la inducción del enraizamiento adventicio (Gaspar *et al.*, 1992, McDonald y Wynne, 2003; Metaxas *et al.*, 2004). En relación a los registros de actividad en extracto crudo de la peroxidasa AIA oxidasa de crisantemo, muestran en general un descenso de actividad que coincide con el momento del surgimiento de las raíces, lo cual es un comportamiento esperado en función de la activación inicial de las peroxidasas involucradas en las primeras etapas del proceso, las cuales disminuyen su actividad una vez formadas las raíces (Bhattacharya, 1988), estos resultados coinciden con los reportados por Chibbar *et al.*, (1979) quienes también encontraron actividad incrementada AIA oxidada durante el enraizamiento de frijol mungo. Así mismo, se puede observar que en el día 5 de tratamiento el extracto con mayor actividad de la enzima fue el obtenido del tratamiento con el RADIX, registrado una velocidad de 150 nmoles de O_2 , en contraste, los tratamientos Control y Derivado 1 registran en el mismo día de muestro una menor velocidad cercana a los 85 nmoles de O_2 , cabe mencionar que en este día de

tratamiento las muestras de Control y Derivado 1 son diferentes significativamente ($\alpha=0.05$) con respecto del Radix. Los resultados descritos pueden ser discutidos en función de dos factores posibles, el primero de ellos relacionado a la menor inducción de raíces que promueve el Control, con lo cual, el nivel endógeno de peroxidasa es menor, así como su actividad. Por otro lado, el segundo factor puede referirse a la mayor inducción de enraizamiento en el tratamiento RADIX y Derivado 1, en los cuales, el Derivado 1 muestra la menor actividad debido posiblemente a la menor afinidad de la enzima por el sustrato sintético, lo que correspondería con lo planteado en Haissig (1986), Wiesmann *et al.*, (1989) y Slovin *et al.*, (1999).

Bioensayo con Clavel (var. América)

A partir de los resultados obtenidos en crisantemo con el Derivado 1, se procedió a evaluar los derivados fosforilados a una concentración de 100 ppm, la cual fue definida a partir de curvas de dosis-respuesta obtenida en ensayos preliminares con esquejes de frijol mungo y clavel (datos no mostrados). En las condiciones descritas se evaluaron los derivados 1, 2, 3, y 4 en esquejes de clavel. La Figura 30 muestra que todos los derivados incrementaron el porcentaje de esquejes enraizados respecto del control, siendo los derivados 2 y 1 los que presentaron el porcentaje más alto con 90 y 75% respectivamente. Cabe mencionar que estos resultados se obtuvieron con una dosificación 100 veces menor que la del producto comercial que es usado por los floricultores y los resultados de enraizamiento fluctúan sobre el 50%. En trabajos donde evaluaron la influencia del frío en el almacenamiento de esquejes de clavel, Garrido *et al.*, (2003) obtuvieron 25% con la variedad Oriana y 90% con la variedad Elsy, utilizando una concentración de AIB 15.3 μM y 9.88 μM . de ANA. Los registros de actividad en extracto crudo de la peroxidasa AIA oxidasa de clavel (Fig. 1) muestran una tendencia similar a la observada en crisantemo. El tratamiento que registra la mayor actividad es el RADIX, en tanto que el Control y Derivado 1, registran tasas menores y similares entre sí, mostrando que en el registro del día 5 estos tratamientos presentan diferencias significativas. En este mismo sentido, esto podría indicar un efecto de la modificación química de las auxinas en la formación de raíces y la actividad de las

enzimas relacionadas, sugiriendo que la condición en la cual la menor actividad de la enzima se asocia con la mayor inducción rizogénica, puede estar vinculada a una menor afinidad de las peroxidasas por los conjugados sintéticos.

Ensayo de actividad de AIAox purificada

Este ensayo era necesario para tener más elementos para confirmar si efectivamente la conjugación permitía un menor reconocimiento de los derivados. Distintos autores señalan que la conjugación puede ser una estrategia para evadir la acción de las enzimas que degradan AIA (Hangarter y Good, 1981). Se midió la actividad AIA oxidasa de las enzimas aisladas y purificadas de clavel y crisantemo en presencia del Derivado 1. Como se puede ver en la figura 32, con el AIA se registró la máxima actividad en las enzimas de ambas especies. En contraste, empleando el Derivado 1 como sustrato se registró una actividad significativamente menor que los controles con AIA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la evaluación del efecto en los extractos crudos, así mismo, refuerzan la idea de la mayor estabilidad de las auxinas conjugadas en presencia de la AIA-oxidasa, tal como lo sugieren Cohen y Bandurski (1982), Balázs *et al.*, (1995) y Davies, (1999), señalando la participación de los conjugados en la destoxificación de AIA y la protección del AIA libre contra la degradación oxidativa. Cabe mencionar que la purificación de la enzima y la caracterización de los parámetros cinéticos y de concentración de actividad, fueron establecidos en un trabajo colateral cuyos resultados no se incluyen en este trabajo.

En resumen, los resultados derivados del presente estudio, muestran que efectivamente la modificación química generada en las auxinas en este trabajo produjo un incremento en la generación de raíces adventicias, muy probablemente debido a que no son reconocidos por el mecanismo enzimático de degradación, permitiendo que su permanencia dentro de la célula se extienda por más tiempo y su efecto sea más duradero. El aporte del presente trabajo a la fisiología de auxinas en plantas y su utilización como enraizadores, consiste entonces en el diseño químico de los derivados auxínicos, la síntesis química de los mismos, su identificación espectroscópica y la evidencia de que se mejora la inducción de raíces adventicias en las especies florícolas aquí estudiadas.

CONCLUSIONES:

- La síntesis de conjugados de auxinas empleando el método de acoplamiento con diclohexilcarbodiimida produce altos rendimientos de los Derivados.
- Los ésteres activos de los conjugados diseñados mostraron incrementos en actividad rizogénica respecto del AIA.
- El indol-3-acetato de *p*-nitrofenilo (Derivado 1) mostró un incremento de 150% en el enraizamiento de esquejes de *Dentranthema grandiflora* respecto del control
- En *Dianthus caryophyllus* (var. América), el Derivado 1 incrementó en un 100% la formación de raíces adventicias, mientras que el Derivado 2 mostró un 66% más respecto del control.
- Lo anterior es significativo desde el punto de vista de que *Dianthus caryophyllus* es una especie considerada de difícil enraizamiento en la práctica florícola.
- La actividad AIA oxidasa de la peroxidasa purificada mostró tasas menores de actividad en los ensayos con el Derivado 1 o con AIB, lo que indica que el derivado elude la acción oxidativa de la enzima.
- La afinidad de AIA oxidasa por los conjugados de auxinas registrada en ensayos *in vitro* disminuye, lo cual sugiere una relación entre la mayor permanencia de las auxinas y por tanto un mayor efecto fisiológico que se traduce en una mayor capacidad rizogénica.

ABREVIATURAS

2,4-D:	2,4-diclorofenoxiacético
AIA:	Ácido Indol-3-acético
AIAox:	AIA oxidasa.
AIB:	Ácido indol-3-butírico
ATP:	Adenosin trifosfato
AIP:	Ácido indolpropiónico
ANA:	Ácido naftalenacético
BSA:	Albúmina de suero de bovino
CG-MS:	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.
ICAMEX:	Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México.
IR:	Infrarrojo
MCPP:	2 metil-4-clorofenoxipropiónico
PNP:	Indol-3-acetato de <i>p</i> -nitrofenilo
Px:	Peroxidasa
TIBA:	Ácido triiodobenzoico.
UV:	Ultravioleta

REFERENCIAS:

- Abel S y A Theologis. 1996. Early genes and auxin action .*Plant Physiology* 111(1):9-17.
- Acosta E, Sánchez J y M Bañón. 2000. Auxinas. En: Azcón-Bieto, J. y M Talón (eds) "Fundamentos de Fisiología Vegetal". Mc Graw-Hill Interamericana, Barcelona. Cap 19. pp. 305-324.
- Álvarez R, Nissen SJ y EG Sutter. 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.
- Amako K, Chen G y K Asada. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase y for the chloroplastic cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol.* 35(3):497-504.
- Atfield E y P Evans. 1991. Developmental pattern of root y shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthine. *J. Exp. Bot.* 42(234): 51
- Bachelard E y B Stowe . 1963. Rooting of cuttings of *Acer rubrum* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Aust. J. Biol. Sci.* 16:751
- Balázs A; Fluck R, Jameton R, Leber P y J Varnes. 1995. A versatile and efficient methodology for the preparation of choline ester auxin conjugates. *Phytochemistry* 40 (4) 1027-1031.
- Baldi B, Maher B, Slovin J y J Cohen. 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.
- Bartel B; LeClère S, Magidin M y B Zolman. 2001. Inputs to the active Indole-3-Acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and Indole-3- butyric acid β -oxidation. *J Plant Growth Regul.* 20:198-216.
- Bhattacharya N. 1988. Enzymes activities during adventitious rooting. En: Adventitious root formation in cuttings.(Davies T, Haissing B, Sankhla, N. eds.) Portland Oregon. Discorides. Cap 7. pp. 88-101.
- Bialek K, Meudt W y J Cohen. 1983. Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections. IAA content and growth response. *Plant Physiol.* 73:130-134
- Bialek K y J Cohen. 1992. Amide-linked indoleacetic acid conjugates may control levels of indoleacetic acid in germinating seedlings of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 100:2002-2007.
- Bialek K, Meudt W, y J Cohen. 1983. Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections. *Plant Physiology* 73:130-134.
- Blakesley D, Weston G y J Hall 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. Part I: Evidence from studies on auxin application, y analysis of endogenous levels. *Plant Growth Regulation* 10: 341
- Blazich F y C Heuser. 1979. A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:63-67.
- 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.

- Campanella J, Ludwig J y C. Town. 1996. Isolation and characterization of mutants of *Arabidopsis thaliana* with increased resistance to growth inhibition by indoleacetic acid-amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 112:745-745.
- Casson S and K Lindsey. 2003. Genes and signalling in root development. *New Phytologist.* 158:11–38
- Chibbar RN, Gurumurti K y K Nanda. 1979. Changes in AIA oxidase activity in rooting hypocotyls cuttings of *Phaseolus mungo* L. *Experientia* 35:202-203.
- Clarkson S, Large P y C Bramforth. 1992. A two-substrate kinetic study of peroxidase cationic isoenzymes in barley malt. *Phytochem* 31(3):743-749.
- Cleland R; Buckley G, Nowbar S, Lew N, Stinemetz C, Evans M y D Rayle. 1991. The pH profile for acid-induced elongation of coleoptile and epicotyl sections is consistent with the acid growth theory. *Planta* 186:70-74.
- Cleland R. 1994. Characteristics and implications of prolonged fusicoccin induced growth of *Avena* coleoptile sections. *Physiol Plant.* 90:655-660.
- Cohen JD y Bandurski, RS.1978. The bound auxins, protection of indole-3-acetic acid from peroxidases catalysed oxidation. *Planta* 139:203-208.
- Cohen JD y Bandursky RS. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol.* 33:403-430
- Cohen, JD, Slovin JP, y A Hendrickson. 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8:197-199.
- Cooper W. 1935. Hormones in relation to root formation on stem cuttings. *Plant Physiol.* 10: 789-794
- Davies R, Goetz D, Lasswell J, Anderson M y B. Bartel. 1999. *IAR3* Encodes an Auxin Conjugate Hydrolase from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 11, 365–376.
- Darbyshire P. 1973. The glycoprotein nature of indoleacetic acid oxidase/peroxidase fractions and their development in pea roots. *Physiol Plant* 29:293-297.
- De Klerk G; Ter Brugge J, Smulders R, y M. Benschop. 1990. Basic peroxidases and rooting in microcuttings of *Malus*. *Acta Hort.* 280:29-36.
- De Vier CL y RL Geneve. 1997. Flowering influences adventitious root formation in chrysanthemum cuttings. *Scientia Horticulturae* 70:309-318
- Díaz-Sala C, Hutchison K, Goldfarb B. y M Greenwood. 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue activity. *Physiol. Plant.* 97:481-490.
- Eriksen E y Mohammed S. 1974. Root formation in pea cuttings II. The influence of indole-3-acetic at different developmental stages. *Physiol Plant* 30:158-162.
- Epstein E y Ludwig J. 1993. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiol Plant.* 88:382-389.

- Fink S. 1972. Adventitious root primordia. the cause of abnormally broad xylem rays in hard- and soft woods. *Int. Assoc. Wood Anatomists.* 3:31-38.
- Fox L, Purves W y H Nakada. 1965. The role of horseradish peroxidase in indole-3-acetic acid oxidation. *Biochem.* 4:2754-2763.
- Fox L y Purves W. 1968. The mechanism of peroxidase catalysis of 3-indoleacetic acid oxidation. In *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Wigtman F. and G Setterfield. (eds.). The Range Press. Ottawa. pp. 301-309
- García F, Calderón A, Muñoz R y B Ros. 1992. The decarboxylative pathway of indole-3-acetic acid catabolism is not functional in grapevine protoplasts. *J. Exp. Bot.* 43(250): 715-721.
- Garrido G; Arnao M, Acosta M y J. Sánchez –Bravo. 2003. Polar transport of indole-3-acetic acid in relation to rooting in carnation cuttings: influence of cold storage duration and cultivar. *Biologia plantarum* 47 (4): 481-485.
- Gaspar T, Kevers C, Hausman JF, Berthon JY y V. Ripetti. 1992 Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie.* 12:757-765.
- Gaspar T y Hofinger M. 1988. Auxin metabolism during adventitious rooting. En: Davis TD, Haissing BE, y N Sankhla, eds. "Adventitious root formation in cuttings. Dioscorides Press. Portland Oregon. pp. 117-131.
- Gaspar T, Penel C, Thorpe T. y H Greppin. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève-Centre de Botanique. Genève. pp.324.
- Gendreau E ; Traas J, Desnos T, Granjean O, Caboche M, y H Hofte. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114:295-305.
- Guerrero J ; Garrido G, Acosta M y J Sánchez. 1999. Influence of 2,3,5-triiodobenzoic and 1-Naphthylphthalamic acid on Indoleacetic acid transport in carnation cuttings: relations with rooting. *J Plant Growth Regulation* 18:183-190
- Gorst J, Slaytor M, y R Fossard. 1983. The effect of indole-3-butyric acid and riboflavina on the morphogenesis of adventitious root of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. grown in vitro. *J. Exp. Bot.* 34:1503:1515.
- Grambow H y Lagenbeck 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.
- Haissig B. 1970a. Performed adventitious root initiation in brittle willow grown in a controlled environment. *Can J. Bot.* 48:2309.
- Haissig B. 1970b. Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. *Planta* 95:27-35.
- Haissig B, Davis T y D Reimenschneider. 1992. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiol Plant* 84: 310-317.
- Haissig B, 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. En *Developments in plant and soil sciences*. New root formation in plants and cuttings. M.B. Jackson, Martinus Nijoff Publishers. pp. 332-345

- Hangarter R. y N Good. 1981. Evidence that IAA conjugates are slow release sources of free IAA in plant tissues. *Plant Physiol.* 68: 1424.
- Hartmann H, Kester D y F Davies. 1990. *Plant Propagation: Principles and Practices*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. pp 246-247.
- Hausman JF. 1993. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. *Plant Growth Regul.* 13:263-268.
- Hinman R y J Lang. 1965. Peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 4:144-158
- Jarvis, BC y Booth, A. 1981. Influence of indolebutyric acid, boron, mandoinositol, vitamin D and seedling age on adventitious root development in cuttings of *Phaseolus aureus*. *Physiol Plant.* 53:213-218.
- Johri S, Jamwal U, Rasool S, Verma V y G Qazi. Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. *Plant Science* 169:1014-1021.
- Kefeli V. 1978. Natural plant growth inhibitors and phytohormones. Dr. W. Junk B. Publishers. The Hague/Boston. pp 277.
- Kenten R. 1955. The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. *Biochem. J.* 59:110-121.
- Key J. 1989. Modulation of gene expression by auxin. *Bio Essays* 11:52-58.
- Kim S y Kim S. 1996. Carbohydrate moieties of three radish peroxidases. *Phytochemistry* 42(2): 287-290.
- Klapper M y D Hackett . 1963. The oxidative activity of horseradish peroxidase. II. Participation of ferro peroxidase. *J. Biol. Chem.* 238:3736-3749.
- Kokkinakis D. y J Brooks. 1979. Tomato peroxidase. Purification, characterization and catalytic properties. *Plant Physiol.* 63:93-99.
- Ludwig-Müller J y E Epstein. 1991. Occurrence y in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.) *Plant Physiol.* 97:765-770.
- Ludwig-Müller J y E Epstein. 1993. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 13:189-195.
- Li L, Hou X, Tsuge T, Ding M, Aoyama T, Oka A, Gu H, Zhao Y y L Qu. 2007. The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep . On line first.* DOI 10.1007/s00299-007-0458-9
- Ljung K; Hull AK, Kowalczyk M. Marchant A, Celenza J. Cohen JD, y G Sandberg. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 49:249-272.
- McDonald y J Wynne. 2003. Adventitious root formation in woody tissue: peroxidase-a predictive marker of root induction in *Betula pendula*. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39:234-235.
- Mato M, Rúa M, y E. Ferro. 1988 Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultures in vitro. *Physiol. Plant.* 72:84-88.
- Mennes A; Quint A, Gribnau J, Boot C, Zaal E, Van-der Maan A, y K Libbenga. 1992. Specific transcription and reinitiation of 2,4-D-induced genes in tobacco nuclei. *Plant. Mol. Biol. Int. J. Mol. Biochem. Genet. Eng.* 18(1):109-117.

- Merckelbach C, Buchala A y H Meier. 1991. Adventitious rooting in cuttings of *Populus tremula*: Metabolism of IAA and IBA. In Proceedings of the 14th Int. Conf. on Plant Growth Substances, Amsterdam, pp. 21-22.
- Metaxas D, Syros T, Yupsanis T y A Economou. 2004. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regulation* 44: 257-266.
- Michalczuk L; Ribnicky D, Cooke, T. y J Cohen. 1992. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol* 100:1346-1353.
- Moncousin C. 1998. Adventitious rhizogenesis control: new developments. *Acta Hort.* 230:97-104.
- Mollan C, Donnelly H y A Harmey. 1972. Synthesis of indole-3-acetylaspatic acid. *Phytochem.* 11:1485-1488
- Monteiro A, Crozier A y G Syberg. 1988. The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seed and seedlings of *Dalbergia dolichopetala*. *Planta.* 174:561-568.
- Moore T. 1969. Comparative net biosynthesis of indoleacetic acid from tryptophan in cell-free extracts of different parts of *Pisum sativum* plants. *Phytochem.* 8:1109-1120.
- Morita Y, Kameda K y M Mizuno. 1962. Studies on phytoperoxidase. XVI. Aerobic destruction of indole-3-acetic catalized by crystalline japanese-radish peroxidase a and c. *Agr. Biol. Chem.* 26.: 442-446
- Nakono M, Kobayashi S. y K Sugioka. 1982. Peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. In: Oxygenases and oxygen metabolism, M. Nozaki ed. Academic Press, New Andork. pp-245-254. ISBN 0-12-522780-9.
- Napier, R. y M Venis. 1995. Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytol* 129:167-201.
- Napoli L; Evidente A, Piccialli G, Santacroce C, Iacobellis N y A Sisto. 1993. Synthesis de N-e- (indole-3-acetyl)-L-Lysine. *Phytochemistry* 33(1): 13-16.
- Nemesis 1.1. 1992. Interactive molecular modeling. *Oxford Molecular Ltd.*
- Nonhebel H, Kruse L, y R Bandurski.. 1985. Indole-3-acetic catabolism in oxindole-3-acetic acid-7'-O-b-D-glucopyranoside. *J. Biol. Chem.* 260:12685-12689.
- Nordström A, Alvarado J y L Eliasson. 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.
- Normanly, J; Slovin J. y J. Cohen. 1995. Rethinking Auxin Synthesis and Metabolism. *Plant Physiol.* 107:323-329.
- Peñalosa I. 1998. Efecto del AIB, el AIA y el fluoroglucinol sobre la respiración en mitocondrias aisladas y la actividad de auxina oxidasas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias-UNAM. pp.120-133.
- Peters W, Richter U y H Felle. 1992. Auxin induced H⁺-pump stimulation does not depend on the presence of epidermal cells in corn coleoptiles. *Planta* 186:313-316.

- Pierik R, Dosterkamp J y M Ebbing. 1997. Factor controlling adventitious root formation of explant from juvenile and adult *Quercus robur* "Fastigiata". *Scientia Horticulturae* 71: 87-92.
- Pluss R; Jenny T y H Meier. 1989. IAA-induced adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* and formation of 2-indolone-3-acetylaspartic acid, a new metabolite of exogenously applied indole-3-acetic acid. *Physiol Plant.* 75:89-96.
- Polle A, Otter T y F Seifert. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.) *Plant Physiol* 106:53-60.
- Pressey R. 1990. Anions activate the oxidation of indole acetic by Peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiol.* 93:798-804.
- Qin G; Gu H, Zhao Y, Ma Z, Shi G, Yang Y, Pickersky E, Chen H, Liu M, Chen Z, y LJ Qu. 2005. An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* 17:2693-2704
- Quint M and WM Gray. 2006. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, 9:448-453
- Rampey R; LeClère S, Kowalczyk M, Ljung K, Sandberg G y B Bartel. 2004. a family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiology* 135:978-988.
- Ray P. 1956. The destruction of indoleacetic acid II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch Biochem Biophys* 64:193-216.
- Ray P. 1958. Destruction of auxin. *Annu Rev Plant Physiol* 9: 81 118
- Ray P y Thimann 1956. The destruction of indoleacetic acid. Action of the enzyme of *Omphalia flavida*. *Arch Biochem Biophys.* 64:175-192.
- Rayle D y R Cleland. 1979. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Current Topics in Developmental Biology.* 11:187-214.
- Rayle D y R Cleland. 1992. The acid growth theory of auxin induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99:1271-127.
- Reinecke, D. y R Bandurski. 1988. Oxidation of Indole-3-acetic acid to oxindole-3- acetic acid an enzyme preparation from *Zea maiz*. *Plant Physiol.* 86:868-872.
- Reyes C. 1980. Bioestadística aplicada. Ed Trillas, México. pp. 111.
- Ribnicky D, Ilic N, Cohen J y T Cooke. 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. *Plant Physiol.* 112:549-558.
- Ricard J y J Nari. 1967. The formation and reactivity of peroxidase compound III. *Biochim. Biophys. Acta.* 132:321-329.
- Riov J y E Epstein. 1988. Comparison of movement and metabolism of indole- 3-acetic acid and Indole-3-butiric acid in mung bean cuttings. *Physiol. Plant.* 74:556-560.
- Ripetti V, Kevers C, Gaspar T. 1994. Two successive media for the rooting of walnut shoots in vitro. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Adv. Hort. Sci.* 8:29-32
- Roberts A y L Fuchigami. 1973. Seasonal changes in auxin effect on rooting of Douglas Fir stem cuttings as related to bud activity. *Physiol. Plant.* 28:215-221.
- Salisbury F y C. Ross. 1994. Fisiología vegetal. 4a ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México. pp. 395. ISBN 970-625-024-7.

- Sánchez de Jiménez, E.; Albores, M. y Loandola V.M. 1981. Effect of 2,4-D analogues on the induction y maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98: 347-353.
- Syberg G, Jenzen E y A Crozier. 1984. Analysis of indole-3-carboxylic acid in *Pinus sylvestris* needles. *Phytochem.* 23:99-102.
- Sasaki K, Sakai S, Kamada H and H Harada. 1992. Regulation of IAA-aminoacid conjugate formation in carrot transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.* 43(256): 1491-1495.
- Saunders B, Holmes A y B Stark. 1964. Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Butterworths, London. pp. 271.
- Scheres B, McKhann H y C Van der Berg. 1996. Roots redefined Anatomical and genetic analysis of root development. *Plant Physiol* 111:959-964.
- Schneider EA y F Wightman. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:487-513.
- Sequeira L y L Mineo. 1996. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.* 41:1200-1208.
- Shannon L, Kay E y J Lew. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 241:2166-2176.
- Slovin J, Bandurski y J Cohent. 1999. Auxin. En : *Biochemistry and Molecular Biology of plant hormones*. Amsterdam, Elaevier. Pp. 115-140.
- Smith D y T Thorpe. 1975a. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings I. *J. Exp. Bot.* 26(91):184-192.
- Smith D y T Thorpe. 1975b. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings II. *J. Exp. Bot.* 26(91):193-202
- Stefancic M, F Stamper y G Osterc.2006. Influence of endogenous IAA levels and exogenous IBA on rooting and quality of leafy cuttings of prunus 'GiSela 5'. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81(3):508-512.
- Srivastava L. 2002. *Plant Growth and Development. Hormones and environment*. Academic Press. Elsevier Science. San Diego pp. 160. ISBN 0-12-660570-X.
- Syros T; Yupsanis T, Zafiriadis H y A Economou. 2004. Activity and isoformes de peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology*; 161:69-77.
- Taiz L y E Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Pub. pp.423-456.
- Talwar G, Dendsay J, y V Gupta. 1985. Kinetic properties of IAA oxidase from mung bean cotyledons. *Phytochemistry* 24(4): 673-686.
- Tanimoto M. 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:249–265,
- Tartoura K, da Rocha A y S Youssef. 2004. Synergistic interaction between coumarin 1,2-benzopyrone and indole-3-butyric acid in stimulating adventitious root formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek cuttings: I. Endogenous free and conjugated IAA and basic isoperoxidases. *Plant Growth Regulation* 42:253-262.

- Teixeira J. 2003. Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum. *Plant Growth Regulation* 39:67-76.
- Thimann K y A Delisle. 1942. Notes on the rooting of some conifers from cuttings. *J. Arnold Arbor.* 23:103-109.
- Thimann K. 1974. Fifty years of plant hormone research. *Plant Physiol.* 54:450-453.
- Tuominen H, Sitbon F, Jacobsson C, Syberg G, Olsson O, y B Sundberg. 1995. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol.* 109:1179-1189.
- Vatulescu A, Fortunato A, Sá M, Amancio S, Ricardo C, P Jackson. 2004. Cloning and characterization of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant physiology and Biochemistry* 42:609-615.
- Van Huystee R. 1987. Some molecular aspects of plant peroxidases biosynthetic studies. *Ann Rev Plant Physiol* 37:509-538.
- Vergara F, Peñalosa I, Vázquez J, Flores C, Hernández L, y N Aranda. 1997. Modelado y síntesis de ésteres alifáticos y cíclicos de AIA y ANA y su evaluación como agentes rizogénicos. XVII Coloquio de Investigación de la ENEP Iztacala.
- Weaver R. 1972. *Plant Growth Substances in Agriculture*. W. H. Freeman y Co. San Francisco, USA. pp. 143-172.
- Wiesman T, Riov J y E Epstein. 1989. Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiol.* 91:1080-1084.
- Wightman F. and K Thimann. 1980. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots I. Sources of primordial-inducing substances in the primary root of pea seedlings. *Physiologia plantarum* 49(1) 13-20.
- Woodward A y B Bartel. 2005. Auxin, action and interaction. *Annals of Botany* 95:(5) 707-735.
- Yamazaki I, Mason H y L Piette. 1960. Identification by electron paramagnetic resonance spectroscopy, of free radicals generated from substrates by peroxidase. *J. Biol Chem.* 235:2444-2449.
- Yee Y, Epstein E y J Normanly. 2000. Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of Indole-3-acetyl-aspartate, Indole-3-acetyl-glutamate, and Indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology* 123:589-595.
- Zimmerman P y F. Wilcoxon. 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Boyce Thompson Inst.* 7:209-229.
- Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, J Chory. 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-309.
- Zhao Y; Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J y JL Celenza. 2002. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome p450s CYP79B2 AND CYP79B3. *Genes Dev.* 16:3100-3112