

¿Interviene la respiración mitocondrial en el mecanismo de formación de raíces adventicias promovida por auxinas?

IGNACIO PEÑALOSA CASTRO; SUSANA GARCÍA SÁNCHEZ Y CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ*

Does Mitochondrial Respiration Participate in the Mechanism of Adventitious Root Formation Promoted by Auxins?

Abstract. *The effect of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on mitochondrial respiration of *Vigna radiata* extracts was studied. Both auxins showed an inhibitory effect and an uncoupler effect on state 4. Rooting activities on *Vigna radiata* cuttings of mitochondrial inhibitors: antimycin A, rotenone, oligomycin, salicylhydroxamic acid, mersalil, and the uncoupler CCCP were also studied. Antimycin, rotenone, oligomycin and salicylhydroxamic acid showed a significant promoting activity ($F \alpha=0.05$, $q\alpha=0.05$) over control group with distilled water. From the results obtained, the possible in vivo effect of auxins on mitochondrial metabolism is discussed as a part of the mechanism of adventitious rooting.*

Introducción

El mecanismo mediante el cual las auxinas estimulan la formación de raíces adventicias ha sido motivo de numerosas investigaciones (Haissig *et al.*, 1992), en virtud de que un conocimiento preciso de dicho fenómeno permitiría su manipulación a voluntad para la propagación asexual de especies vegetales de interés comercial.

No obstante los diversos enfoques fisiológicos y bioquímicos que documentan el papel del ácido indol-3-acético (AIA) en la iniciación de raíces (Blakesley *et al.*, 1991; Napier y Venis, 1995), existe escasa información que involucre al metabolismo mitocondrial como parte de la secuencia de eventos de este proceso. Existen reportes acerca del efecto de la auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre mitocondrias

aisladas de *Solanum tuberosum*, donde se encontró que el 2,4-D se comporta como inhibidor-desacoplante (Roussaux *et al.*, 1986; Pireaux y Dizengremel, 1990). Por otro lado, se ha observado que compuestos plenamente reconocidos como desacoplantes de la respiración mitocondrial, como el 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP), estimulan significativamente la rizogénesis en *Vigna radiata* (Mitsubishi y Sibaoka, 1981; Riov y Fa Yang, 1989), pero no hay reportes que establezcan la relación entre uno y otro efectos.

En los trabajos previamente citados, no se considera una relación entre el bloqueo de la síntesis mitocondrial de ATP y la formación de raíces adventicias. Por otro lado, al utilizar una auxina sintética como el 2,4-D, se dificulta analizar las posibles implicaciones fisiológicas de estos efectos. Con este propósito, conviene emplear AIA y ácido indol-3-butírico (AIB) que son auxinas naturales (Epstein y Müller, 1993). En cuanto al 2,4-DNP, es sólo uno de la amplia gama de desacoplantes e inhibidores mitocondriales de que se disponen actualmente, como: rotenona que inhibe el sitio 1 de fosforilación; antimicina A que inhibe el sitio 2 de fosforilación; oligomicina que inhibe la subunidad F₀ de la ATPsintetasa mitocondrial; mersalil que inhibe al transportador de fosfatos en mitocondria; salicilhidroxámico que inhibe la vía alterna en mitocondrias vegetales; y, carbonilcianuro-*m*-cloro-fenilhidrazona (CCCP) el cual actúa como un potente desacoplante mitocondrial (Storey, 1980; Tzagoloff, 1982). Estos compues-

* Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Jefatura de Biología. Apdo. postal 314. Av. de los Barrios s/n, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C.P. 54090. Tel.: (915) 6 23 11 49, fax: 3 90 59 00. E-mail: ipcastro@servidor.dgsca.unam.mx



tos se podrían emplear para hacer una caracterización más completa del estímulo observado.

El propósito del presente trabajo es la caracterización del efecto del AIA y AIB sobre la respiración mitocondrial y si existe como característica común un efecto promotor rizogénico en los diferentes inhibidores probados de las funciones mitocondriales, así como la caracterización del efecto del AIA y AIB sobre la respiración mitocondrial, utilizando como modelo experimental plántulas de *Vigna radiata*, en virtud de que es una especie de fácil enraizamiento (Hess, 1961) y es fuente de extractos mitocondriales satisfactoriamente acoplados (Bonner, 1967).

I. Materiales y métodos

1. Obtención de plántulas de *Vigna radiata*

Se lavaron 40 g de semillas de *Vigna radiata* de origen comercial con agua corriente, posteriormente se sumergieron en 100 ml de solución de hipoclorito de sodio al 4% durante 25 minutos; el desinfectante empleado se eliminó mediante cinco lavados con 500 ml de agua destilada cada uno, mientras que la remoción del hipoclorito fue verificada a través del cambio en la textura de la testa de la semilla. Durante las siguientes 24 horas se mantuvieron sumergidas en agua destilada, en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 28°C y con cambios de agua cada seis horas. Una vez que las semillas se hidrataron, se trasladaron a un recipiente de 25 x 35 x 10 cm, preparado previamente con agrolita a un 50% de su capacidad; la agrolita se mantuvo a su máxima hidratación con el uso exclusivo de agua destilada. Este recipiente permaneció durante cinco días en una cámara de germinación con oscuridad permanente, a una temperatura de 28°C y humedad relativa de 40%. Al término de este periodo se obtuvieron plántulas etioladas de 12 cm de longitud promedio medidos del brote de la raíz principal al ápice.

2. Bioensayo de rizogénesis

A partir del método anterior se obtuvieron plántulas que fueron cosechadas al eliminar la radícula por medio de un corte a una distancia de 5 cm por abajo del nodo cotiledonar, que más adelante serán nombradas como estacas. Se formaron grupos aleatorios de tratamientos con 30 estacas cada uno, colocados en vasos de pp de 80 ml, con un contenido de 40 ml de solución con los trata-

mientos de auxinas, desacoplante e inhibidores de la actividad mitocondrial que a continuación se describen: control con agua destilada, AIA 10 μM (Sigma I-1250), AIB 10 μM (Sigma I-5386), CCCP 5 μM (Sigma C-2920), ácido mersalílico 100 μM (Sigma M-9784), rotenona 50 μM (Sigma R-8875), antimicina A 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Sigma A-8674), oligomicina 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Sigma O-4876) y ácido salicilhidroxámico 100 μM (Sigma S-7504). Los grupos de estacas se mantuvieron en tratamiento durante 24 horas, posteriormente fueron lavadas con agua destilada y colocadas en vasos de pp de 80 ml con 40 ml de agua destilada; así se conservaron durante cinco días, para realizar el conteo de las raíces formadas. Las raíces se conservaron en oscuridad a 28°C y humedad relativa de 40%.

3. Aislamiento de mitocondrias

La fracción mitocondrial se obtuvo con un método general para la preparación de mitocondrias vegetales (Bonner, 1967). Se partió de las plántulas etioladas descritas anteriormente, a las cuales se les removió la raíz y el epicotilo; 100 g de hipocotilos con estas características se homogenizaron en 120 ml de medio que contenía: manitol (Sigma M-9647) 0.3 M; ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)-N, N, N', N'-tetrácetico (EGTA Sigma E-4378) 2 mM; L-cisteína (Sigma C-7755) 4 mM; polivinilpolipirrolidona insoluble (Sigma P-6755) 0.1%; albúmina sérica de bovino (ASB Sigma A-4503) 0.1 % y pH 7.4 ajustado con Tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIZMA Sigma T-1503) en una licuadora durante ocho segundos. El homogenizado se filtró por ocho capas de gasa con malla de 2 mm; se ajustó el pH a 7.4 nuevamente con TRIZMA y se centrifugó a 1,500 x g durante diez minutos, se recuperó el sobrenadante por decantación y se centrifugó a 10,000 x g durante diez minutos; se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 25 ml de medio de lavado que contenía: manitol 0.3 M; EGTA 1 mM; ASB 0.1%; pH 7.4-TRIZMA y se centrifugó a 8,000 x g durante diez minutos; posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de medio de lavado, esta última correspondió a la fracción mitocondrial. La proteína mitocondrial se cuantificó mediante la técnica rápida y sensible de azul de Commassie (Bradford, 1976), donde se utilizó ABS como estándar. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C.

4. Efecto de auxinas sobre la respiración mitocondrial

La determinación del efecto de las auxinas AIA y AIB sobre la respiración mitocondrial se realizó mediante el monitoreo polarográfico de la disminución de oxígeno en una celda de reacción con electrodo tipo Clark (Hansatech modelo DW1). Se adicionaron 100 µg de proteína mitocondrial a 1 ml de medio de reacción que contenía: manitol 0.3 M; KH₂PO₄ 10 mM (Sigma P-5379); MgCl₂ 5 mM (Sigma M-8366) y KCl 10 mM (Sigma P-4504), pH 7.6-TRIZMA. Se agregó β-nicotinamida adenindinucleótido forma reducida 1 mM (NADH, Sigma N-6005), esta mezcla de reacción se mantuvo a 30°C y con agitación de 200 rpm, cuando la reacción disminuyó su velocidad, se adicionó adenosin 5'-difosfato 100 µM (ADP, Sigma A-6646), de esta forma se estableció el estado 3 (EDO 3, respiración activa); eventualmente se agotaba el ADP y la respiración entraba a estado 4 (EDO 4, respiración pasiva), si era necesario se adicionaba nuevamente ADP para un segundo EDO 3. Finalmente, se verificó el acoplamiento de la muestra mitocondrial al adicionar en EDO 4 CCCP 5 µM. El efecto de las auxinas se cuantificó agregando AIA y AIB (10 a 100 µM) a la mezcla de reacción durante EDO 3 y EDO 4 independientemente. La cuantificación de los parámetros respiratorios de EDO 3, EDO 4, relación ADP-oxígeno (P/O) y control respiratorio (CR) en presencia y ausencia de auxinas se valoró de acuerdo al método gráfico convencional (Bonner, 1967) descrito en la figura 1.

II. Resultados

Los resultados obtenidos en el bioensayo rizogénico en presencia de auxinas, inhibidores y desacoplante de la respiración mitocondrial se presentan en la figura 2, donde se puede observar que la máxima promoción resulta con el tratamiento con AIB, formándose 68.12 raíces por estaca, en tanto que el grupo Control formó 18.7. El análisis de varianzas de los datos indica diferencias significativas ($F \alpha=0.05$) entre los nueve grupos experimentales, la posterior comparación de diferencias entre las medias de los tratamientos a través de la prueba de Tukey modificada para diferentes tamaños de muestras entre los grupos (Daniel, 1987), arroja diferencias significativas ($q \alpha=0.05$) entre el grupo Control y los inhibido-

FIGURA 1. EXPERIMENTO TÍPICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE AIA Y AIB SOBRE LOS PARÁMETROS RESPIRATORIOS DE EDO 3, EDO 4, P/O Y CR.

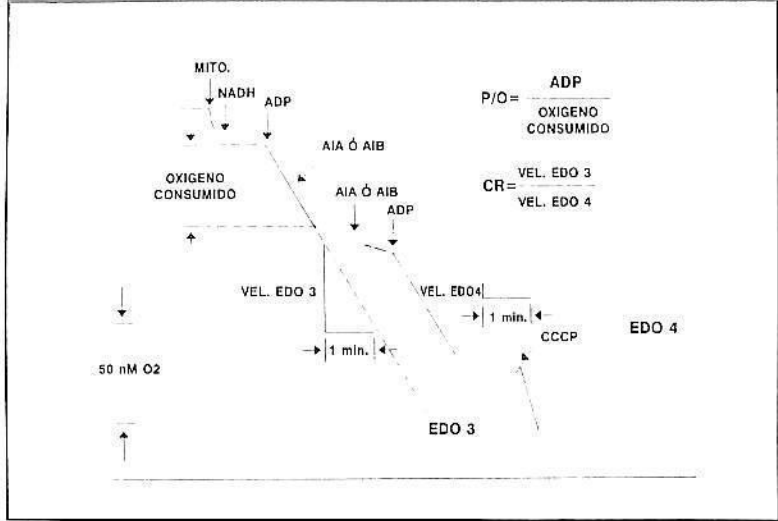


FIGURA 2. EFECTO DE AUXINAS, INHIBIDORES Y DESACOPLANTES SOBRE LA FORMACIÓN DE RAICES ADVENTICIAS.

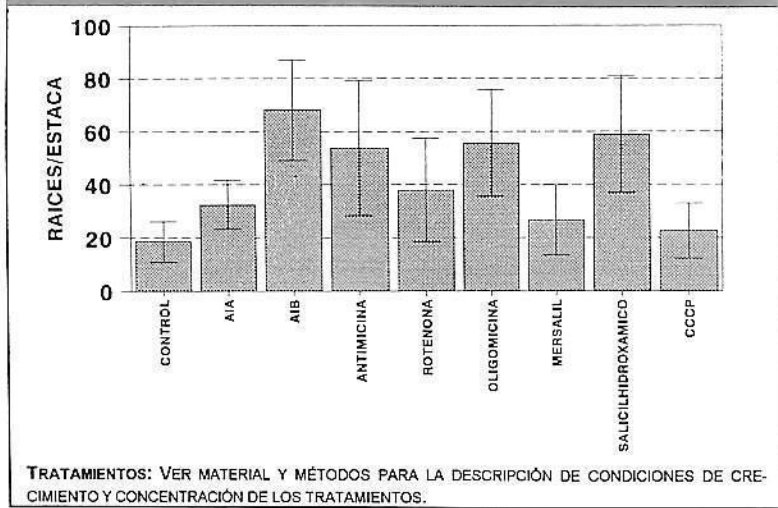


FIGURA 3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AIA Y AIB SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN EDO 3.

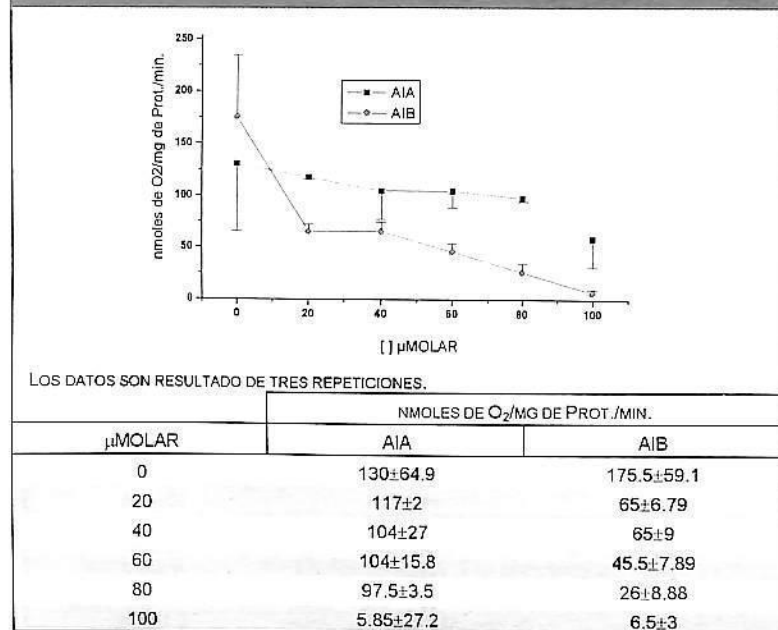


FIGURA 4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AIA Y AIB SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN EDO 4.

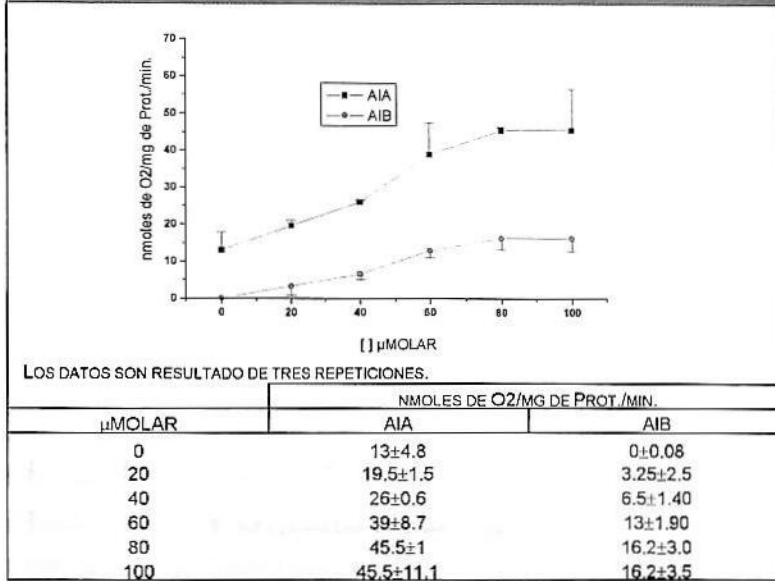


FIGURA 5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AIA Y AIB SOBRE LA RELACIÓN P/O.

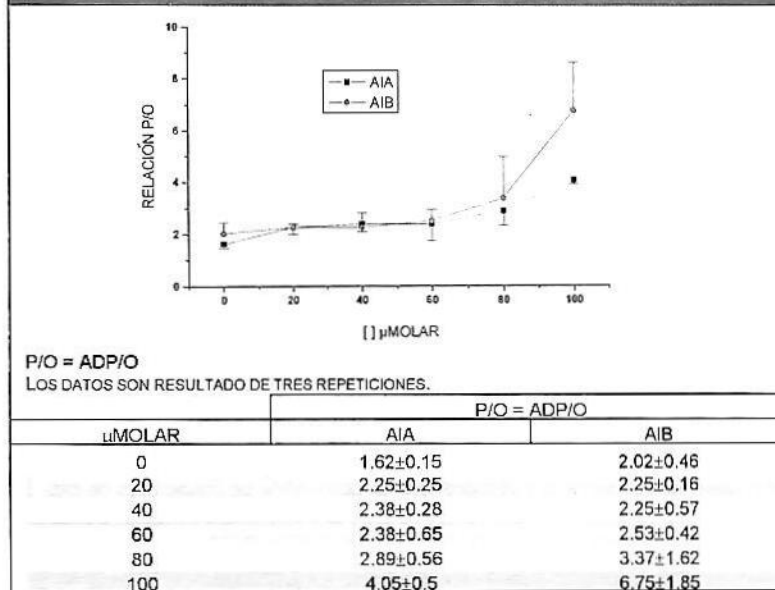
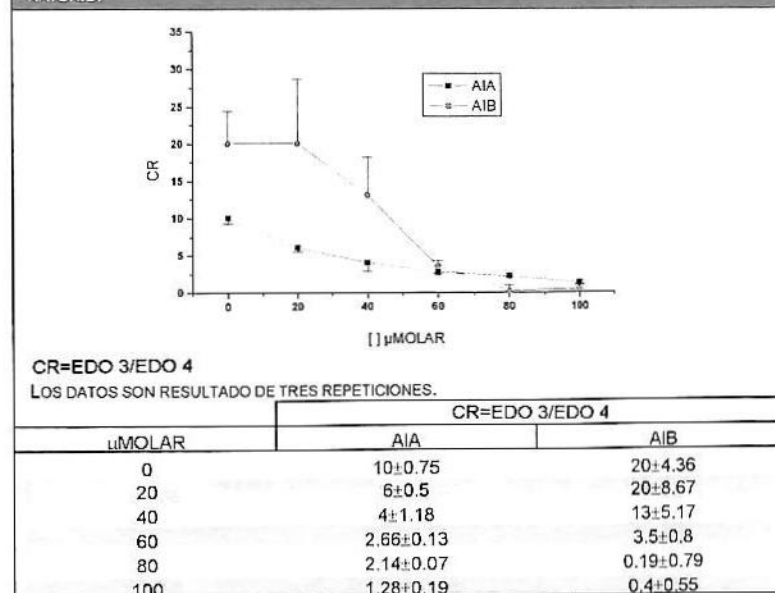


FIGURA 6. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AIA Y AIB SOBRE EL CONTROL RESPIRATORIO.



res antimicina, rotenona, oligomicina y salicilhidroxámico, en tanto que el grupo tratado con el desacoplante CCCP, con AIA y mersalil no muestra diferencia significativa ($q \alpha=0.05$) respecto al grupo Control.

Los resultados del efecto de las auxinas sobre la respiración mitocondrial son producto de tres repeticiones independientes del experimento descrito en material y métodos. Como se puede observar en la figura 3, la presencia de AIA y AIB disminuye la velocidad del EDO 3 en las mitocondrias, pues actúan como inhibidores durante este estado de la respiración. Para el caso de AIB es mayor este efecto, puesto que a una concentración de 100 μM en el medio de reacción, disminuye la velocidad de consumo de oxígeno de 170.55 a 6.5 nmoles de $\text{O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (96% de inhibición); por su parte el AIA a la misma concentración disminuye la velocidad de consumo de 130 a 50.85 (60% de inhibición).

Por otro lado, cuando se aplicó AIA y AIB sobre la respiración en EDO 4, como se puede observar en la figura 4, la velocidad de consumo de oxígeno se incrementó en ambos casos, es decir, actuaron como desacoplantes en el EDO 4. Este desacoplamiento es más importante para el caso de AIA, el cual, a concentración de 100 μM , aumenta el consumo de oxígeno de 13 a 45.5 nmoles de $\text{O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$; mientras que el AIB a la misma concentración aumenta el consumo de oxígeno de 0 a 16.2.

El comportamiento de las auxinas AIA y AIB como inhibidores en EDO 3 y desacoplantes en EDO 4, también se manifestó al evaluar su efecto en la relación P/O, como se puede observar en la figura 5, donde la relación P/O aumenta de un nivel normal de 2, a 4.05 y 6.75 para los tratamientos con AIA y AIB respectivamente. Finalmente, en la figura 6 se puede observar cómo el cociente respiratorio se abate a valores cercanos a cero cuando la concentración de las auxinas en el medio de reacción se incrementa hasta 100 μM .

III. Discusión

Los resultados del presente trabajo indican un importante efecto *in vitro* de las auxinas AIA y AIB sobre la respiración mitocondrial de extractos de *Vigna radiata* y concuerdan con el efecto inhibidor-desacoplante observado al emplear la auxina sintética 2,4-D en extractos de *Solanum tu-*

berosum (Roussaux *et al.* 1986; Pireaux y Dizengremel, 1990). Esta combinación de efectos inhibitorio y desacoplante en el mismo compuesto, podría estar explicada por la existencia de la vía alterna de respiración presente en los vegetales (Bahr y Bonner, 1973; Moreland, 1980), debido a que el efecto inhibitorio observado en EDO 3 corresponde al flujo electrónico de la cadena normal de citocromos, mientras que la respiración pasiva en EDO 4 se asocia estrechamente con el flujo de electrones sobre la cadena alterna, de esta forma es posible que las auxinas AIA y AIB afecten diferencialmente cada una de las vías. Es importante notar que las concentraciones empleadas de AIA y AIB, manifiestan efecto inhibitorio a partir de una concentración de 20 μM , la cual se puede considerar cercana a la concentración fisiológica; de esta forma, es razonable pensar que el efecto observado *in vitro* no sea resultado de interacciones inespecíficas, más bien, los datos presentados dan sustento a la posibilidad de que el AIA y AIB interaccionan naturalmente con el metabolismo mitocondrial. Asimismo, es sugerente la correlación de mayor efecto inhibitorio por parte de AIB asociado con mayor estímulo rizogénico.

La promoción rizogénica observada con los inhibidores de la respiración refuerza la posible vinculación del metabolismo mitocondrial con el estímulo auxínico; por otro lado, el desacoplante CCCP no produjo un efecto promotor significativo a pesar de ser un compuesto que disminuye la síntesis de ATP. Sin embargo, es necesario demostrar que el CCCP tiene acceso a las mitocondrias del tejido, a fin de considerar que es una excepción a la relación aquí reportada.

Bajo el supuesto mencionado, es legítimo preguntarse cuál sería el significado fisiológico del comportamiento inhibitorio-desacoplante observado por el AIA y el AIB, debido a que eventualmente conduciría a una disminución en la concentración celular de ATP. Este efecto iría en detrimento de un proceso que se caracteriza por la elevada tasa de división celular que depende de energía y difiere de lo encontrado en *Pinus banksiana*, donde la concentración de ATP se incrementa durante la formación de raíces adventicias (Haissig, 1990).

Es evidente que los elementos de análisis de este trabajo no permiten discriminar sin reservas la concordancia del efecto *in vitro* estudiado con el efecto *in vivo*, pues tampoco ubican indiscutiblemente la inhibición mitocondrial como parte de

un proceso integral de regulación, sin embargo establecen dudas razonables sobre su posible correlación. ◆

BIBLIOGRAFÍA

- Bahr, J. y Bonner, W. (1973). "Cyanide-insensitive respiration", en *The J. of Biol Chem.*, Vol. 218.
- Blakesley, D.; Weston, G. y Hall, J. (1991). "The role of endogenous auxin in root initiation", en *Plant Growth Regul.*, Vol. 10.
- Bonner, W. (1967). "A general method for the preparation of plant mitochondria", en *Methods in Enzymology*, Vol. IX.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein", en *Anal. Biochem.*, Vol. 72.
- Daniel, W. (1987). *Biostatística*. Limusa, México.
- Epstein, E. y Müller, J. (1993). "Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport", en *Physiol. Plant.*, Vol. 88.
- Haissig, B. (1990). "ATP concentrations in *Pinus banksiana* cuttings during adventitious rooting", en *J. Plant Physiol.*
- Haissig, B.; Davis, T. y Riemenschneider, D. (1992). "Researching the controls of adventitious rooting", en *Physiol. Plant.*, Vol. 84.
- Hess, C. (1961). "The mung bean bioassay for the detection of root promoting substance" en *Plant. Physiol.*, 36 XXI.
- Mitsubishi, M. y Sibaoka, H. (1981). "Effects of actinomycin D and 2,4-dinitrophenol on the development of root primordia in azuki bean stem cuttings", en *Plant and Cell Physiol.*, Vol. 22.
- Moreland, D. (1980). "Mechanism of action of herbicides", en *Ann. Rev of Plant Physiol.*, Vol. 31.
- Napier, R. y Venis, M. (1995). "Auxin action and auxin-binding proteins" en *New Phytol.*, 129. 167-201.
- Pireaux, J. y Dizengremel, P. (1990). "Effects of a quaternary ammonium salt and 2,4-D on potato tuber mitochondria", en *J. Plant Physiol.*, 136. 349-355.
- Riov, J. y Fa Yang, S. (1989). "Enhancement of adventitious root formation in mung bean cuttings by 3,5-dihalo-4-hydroxybenzoic acids and 2,4-dinitrophenol", en *Plant Growth Regul.*, 8. 277-281.
- Roussaux, J.; Dizengremel, P. y Chauveau, M. (1986). "Inhibition of mitochondrial oxidations by adenine-derivatives and auxin related compounds", en *J. Plant Physiol.*, 123. 55-67.
- Storey, B. (1980). "Electron transport and energy coupling in plant mitochondria", en Davies, D. (ed), *The biochemistry of plants*, Vol. 12. Academic Press, New York.
- Tzagoloff, A. (1982). *Mitochondria*. Plenum Press, New York.