

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EFECTO DE AUXINAS NATURAL Y SINTÉTICAS
SOBRE LOS NIVELES DE FOSFOLÍPIDOS DE
INOSITOL PRESENTES EN MAÍZ”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

BIOL. BEATRIZ BUENTELLO VOLANTE

TUTOR:

Dra. LAURA J. PÉREZ FLORES

ASESORES:

Dra. ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ

M. en C. FERNANDO DÍAZ DE LEÓN SÁNCHEZ

M. en C. RAÚL G. AGUILAR CABALLERO

México, D. F.

ABRIL 2002

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del padrón de programas de posgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACYT con número 153010.

*“Conocimientos puede tenerlos cualquiera, pero el arte
de pensar es el regalo más escaso de la naturaleza”*

Federico II el Grande

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Laura J. Pérez Flores por todos sus comentarios durante la dirección de esta tesis, por su apoyo en momentos críticos y por su preocupación para la conclusión satisfactoria de este trabajo.

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por su valiosa asesoría y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez por sus comentarios y por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, estando siempre presente en los momentos difíciles.

Al M. en C. Raúl G. Aguilar Caballero por su asesoría y por el apoyo técnico brindado para la conclusión satisfactoria del presente trabajo.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor y a Ligia Brito por la valiosa enseñanza de nuevas técnicas que complementaron este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio dirigido por la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal que siempre me apoyaron y por su invaluable amistad. Gracias Chicos.

DEDICATORIAS

*A mis padres, Salomón y Ma. Esther,
porque con amor siempre me han alentado,
por su apoyo y comprensión en todo momento.*

*A Higinio por ser el mejor esposo,
porque con su amor me dio motivos
para seguir adelante y por todo su apoyo
durante la realización de esta tesis. Gracias.*

*A mi hermano quien ha estado a mí lado
en todo momento. Suerte.*

*A mis Abuelitos que siempre han estado
cerca de mí, gracias por su apoyo y cariño.*

*A mis tíos, tías y primos que de
una u otra manera me han apoyado.
Gracias por estar cerca.*

*A mis suegros, Higinio y Lupita,
por su cariño y apoyo.*

*A todos las personas que me
han brindado su amistad.
Gracias.*

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	1
ANTECEDENTES.....	2
1. EFECTOS GENERALES DE LAS AUXINAS.....	2
2. EFECTO DE LAS AUXINAS EN MAÍZ.....	3
3. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	5
4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES A TRAVÉS DEL SISTEMA DE FOSFOINOSÍTIDOS.....	7
4.1 Sistema de fosfoinosítidos en animales	7
4.1.1. Fosfolipasa C (PLC).....	7
4.1.2 Fosfolipasa A (PLA).....	9
4.1.3 Fosfolipasa D (PLD)	10
4.1.4 Fosfatidil inositol 3 fosfato (PI 3P).....	10
4.1.5 Fosfatidil inositol 4 fosfato (PI 4P).....	10
4.1.6 Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 P ₂).....	10
4.1.7 Ácido fosfatídico (PA)	11
4.1.8 Liso-Fosfolípidos (LP)	11
4.2 Sistema de fosfoinosítidos en plantas.....	11
4.2.1. Fosfolipasa C (PLC).....	12
4.2.2 Fosfolipasa A (PLA).....	12
4.2.3 Fosfolipasa D (PLD)	13
4.2.4 Fosfatidil inositol 3 fosfato (PI 3P).....	13
4.2.5 Fosfatidil inositol 4 fosfato (PI 4P).....	13
4.2.6 Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 P ₂).....	14
4.2.7 Ácido fosfatídico (PA)	14
4.2.8 Liso – Fosfolípidos (LP)	14

5. METABOLISMO DE INOSITOL Y DERIVADOS DE INOSITOL	15
5.1 Fosfatidil inositol 3 fosfato (PI 3P).....	15
5.2 Fosfatidil inositol 4 fosfato (PI 4P).....	15
5.3 Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 P ₂).....	15
5.4 Inositol 1,4,5 trifosfato (IP ₃) como segundo mensajero.....	16
5.5 Ácido fosfatídico (PA)	18
5.6 Liso – Fosfolípidos (LP)	19
6. VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES PARA AUXINAS.....	19
6.1 Receptor	19
6.2 Proteínas G	20
6.3 Efectos de auxinas en fosfolipasas, niveles de Inositol 1,4,5- trifosfato (IP ₃) y otros fosfolípidos derivados de inositol	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
METODOLOGÍA.....	25
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
a) Obtención de ejes embrionarios completos, raíz y parte aérea del eje embrionario.....	25
b) Obtención de la parte aérea del eje embrionario en diferentes etapas de desarrollo.....	26
2. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS MICROSOMALES	26
3. EXTRACCIÓN DE LOS DERIVADOS FOSFORILADOS DE FOSFATIDIL INOSITOL	27
4. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS DERIVADOS FOSFORILADOS DE FOSFATIDIL INOSITOL	27
5. CUANTIFICACIÓN DE INOSITOL 1,4,5 TRIFOSFATO (IP ₃).....	28

6. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE DERIVADOS FOSFORILADOS DE INOSITOL	
UTILIZANDO [γ - ^{32}P] ATP	28
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
BIBLIOGRAFÍA	46

ABREVIATURAS

4-C1-AIA	Ácido 4-Cloro-indol- 3-acético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
α -ANA	Ácido 1-naftalenacético
β -ANA	Ácido 2-naftalenacético
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DAG	1,2 diacilglicerol
DAGK	DAG cinasa
DAGPP	DAG pirofosfato
DICAMBA	Ácido 3,6 dicloro o-anísico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GTP γ S	Análogo no hidrolizable de GTP
IP	Inositol fosfato
IP ₂	Inositol bifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
LP	Liso-Fosfolípido
PA	Ácido fosfatídico
PA fosfatasa	Ácido fosfatídico fosfatasa
PAK	Ácido fosfatídico cinasa
PI 3,4P ₂	Fosfatidil inositol 3,4 bifosfato
PI 3,5P ₂	Fosfatidil inositol 3,5 bifosfato
PI 3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PI 3P	Fosfatidil inositol 3 fosfato
PI 4,5 P ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PI 4K	Fosfatidil inositol 4 cinasa
PI 4P	Fosfatidil inositol 4 fosfato
PI 5K	Fosfatidil inositol 5 cinasa

PI 4P 5K	Fosfatidil inositol 4 fosfato 5 cinasa
PKC	Poteín cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PR	Proteína ribosomal
PR S6	Proteína ribosomal S6
ZmIGF	Factor semejante a insulina de maíz

RESUMEN

Las auxinas son hormonas vegetales que provocan diferentes respuestas, clasificadas como: de elongación celular (respuestas trópicas), de división celular (iniciación de las raíces laterales) y de diferenciación (tejido vascular y formación de callos). Existen reportes de un posible receptor membranal para auxinas (ABP1) y de la participación de los fosfolípidos de inositol en la vía de transducción de estas hormonas. Estas hormonas se han asociado con la estimulación de fosfolipasas, específicamente PLA_2 y PLC. Así que los cambios en el metabolismo de los fosfolípidos de inositol pueden ser parte de un sistema de comunicación intracelular entre la membrana plasmática y los efectos de estas hormonas.

El objetivo del presente trabajo es profundizar en el conocimiento de la(s) vía(s) de transducción de señales inducida por auxinas (natural y sintéticas) en maíz.

La cromatografía en capa fina permitió separar e identificar PI, PIP, PIP_2 y PA. En general se observó que la imbibición de los granos de maíz cambia el patrón de fosfoinosítidos con respecto al grano seco. La aplicación exógena de auxinas altera el patrón de fosfoinosítidos con respecto al testigo (granos imbibidos en agua) lo cual apoya la idea de la participación de estos fosfoinosítidos en el mecanismo de acción de estas hormonas. El patrón de fosfoinosítidos como respuesta a las auxinas depende de los tejidos analizados (eje completo, radícula y parte aérea) y de la etapa de desarrollo del tejido analizado (parte aérea sin emerger, recién emergida o de 1cm. de longitud).

ANTECEDENTES

1. Efectos generales de las auxinas

Las auxinas constituyen un pequeño grupo de hormonas vegetales identificadas en 1937 por Went y Thimann debido a su efecto promotor de respuestas trópicas (Sitbon y Perrot, 1997). La auxina natural, considerada como la más importante, es el ácido indol-3-acético (AIA), (Napier y Venis, 1991; Sitbon y Perrot, 1997), se han identificado otras auxinas naturales como: el 4-Cloro-ácido indol-3-acético (4-Cl-AIA) y el ácido indol-3-butírico (AIB). Las auxinas sintéticas se utilizan por inducir efectos similares a las naturales y también como herbicidas, como por ejemplo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1-naftalenacético (α -ANA) y el ácido 3,6 dicloro o-anímico (DICAMBA) (Sitbon y Perrot, 1997).

Las auxinas controlan múltiples procesos a diferentes niveles (Walker y Estelle, 1998; Guilfoyle y col., 1998):

A nivel de la planta completa regulan:

- La dominancia apical
- Las respuestas trópicas
- La formación de raíces laterales
- El desarrollo de tejidos vasculares
- La senescencia

A nivel celular regulan:

- La división celular
- La elongación celular
- La diferenciación celular

A nivel molecular:

- Inducen la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática (Macdonald, 1997).
- Inducen la expresión de genes específicos en diversos tejidos “blanco” (como tejidos en elongación, células en división, etc.), denominados genes de respuesta a auxinas. Entre los que se encuentran la familia Aux/IAA, la familia SAUR, la familia GH3, y algunos que codifican para proteínas ribosomales (Gantt y Key, 1985; Abel y Theologis, 1996).
- Se han asociado con cambios en el patrón de proteínas sintetizadas y con la inducción de la fosforilación de algunas proteínas como las ribosomales (Pérez y col., 1990; Hobbie y col., 1994).

2. Efecto de las auxinas en maíz

La adición de auxinas exógenas en bajas concentraciones (2 a 4 mg/L) a ejes embrionarios de maíz induce el desarrollo de raíz y en altas concentraciones (20mg/L) induce la desdiferenciación del tejido formándose un callo (Sánchez de Jiménez y col., 1981). Por otra parte, la aplicación de auxinas exógenas (10 μ M) a coleóptilos de maíz induce su elongación (Edelmann y Schopfer, 1989; Park y col., 2001), y en raíces (10 μ M) produce una inhibición en el crecimiento de las mismas (Meuwly y Pilet, 1991). Como se indicó anteriormente, las auxinas alteran el patrón de proteínas sintetizadas al aplicarse a ejes embrionarios de maíz en germinación (Pérez y col., 1987) y este cambio está acompañado por un aumento en la fosforilación de proteínas ribosomales, entre las que se encuentra la proteína S6 de la subunidad 40S (PR S6) y su fosforilación también se induce en respuesta a auxinas (Pérez y col., 1990; Sánchez de Jiménez y col., 1997; Beltrán y col., 2001).

La traducción específica de ARNm denominados 5' TOP, se ha observado en concordancia con la fosforilación de la PR S6, en ejes embrionarios de maíz tratados con auxinas. Algunos de estos mensajes se han identificado a través de su reclutamiento específico dentro de los polisomas. Entre los ARNm 5' TOP traducidos específicamente por auxinas, se encuentran los de la PR S6 y del factor de iniciación eIF-iso4E (Dinkova y col., 2000; Beltrán y col., 2001).

La cinasa mTOR, en mamíferos, gobierna el crecimiento y la proliferación celular inducida por mitógenos y regula la traducción de mensajeros 5' TOP. Esta cinasa actúa a través de una vía de señalización en la que participa la acumulación de ácido fosfatídico dependiente de la activación de la fosfolipasa D y es inhibida por rapamicina (Jefferies y col., 1997; Fang y col., 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que la aplicación de insulina exógena tiene efectos similares a las auxinas, acelerando la germinación y el crecimiento de las plántulas de maíz, además de estimular la fosforilación preferencial de la PR S6. Asimismo, se ha aislado un factor semejante a insulina (ZmIGF) en ejes embrionarios y semillas germinadas de maíz, el cual incrementa la síntesis de proteínas ribosomales, acelera el proceso de germinación y estimula el crecimiento de las plántulas de manera similar a la insulina (García y col., 2001). Estos datos sugieren que la vía de transducción de las auxinas podría tener elementos en común con la vía de transducción de insulina o del factor ZmIGF.

Sin embargo, el mecanismo de acción a nivel molecular de las auxinas en maíz no se conoce con precisión. Se han identificado algunos intermediarios y propuesto algunos pasos de la vía de transducción de auxinas en las respuestas de elongación celular en hipocótilo de soya y maíz, tallo de soya, coleóptilo de avena y maíz y raíz de chícharo (Eliasson y col., 1989; Cheung y Cleland, 1991; Hobbie y col., 1994), de división celular en células en cultivo de *C. roseus* y zanahoria y en tejido meristemático de maíz (Ettlinger y Lehle, 1988; Macdonald, 1997).

El conocimiento de los intermediarios de la(s) vía(s) de transducción de señales de auxinas desde su percepción hasta la regulación de la expresión genética u otras respuestas, podrían ser la clave para entender el(los) mecanismo(s) de acción primario(s) de estas hormonas vegetales (Abel y Theologis, 1996).

3. Vías de transducción de señales

La célula responde a estímulos externos u hormonales a través de un proceso conocido como transducción de señales, en el que la información de la presencia del estímulo pasa al interior de la célula y se produce una(s) respuesta(s) específica(s). En general, en este proceso se reconocen varias etapas (Karp, 1996):

- A. Reconocimiento del estímulo mediante un receptor específico (localizado en la superficie externa de la membrana plasmática o en el interior de la célula). Entre estos receptores se encuentran los siguientes (Figura 1):
 - Receptores unidos a canales iónicos.
 - Receptores unidos a proteínas que unen GTP (proteínas G) y que regulan la respuesta celular a hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores.
 - Receptores unidos a enzimas.
- B. Transmisión de la señal a las moléculas efectoras que desencadenan la(s) respuesta(s) celular(es) específica(s). La recepción del efector en la membrana plasmática, hace que rápidamente entren en actividad distintos sistemas de transducción. Algunos activan la enzima adenilato ciclasa que forma AMP cíclico, como segundo mensajero. En otros se activan fosfolipasas como la PLC que hidroliza fosfoinosítidos produciendo como segundos mensajeros el inositol 1,4,5

trifosfato (IP_3) y el 1,2 diacilglicerol (DAG). A su vez el IP_3 causa la liberación al citosol del calcio almacenado en compartimientos celulares. Los segundos mensajeros pueden provocar cascadas de reacciones de fosforilación/defosforilación mediadas por cinasas y/o fosfatasas.

- C. Cese de la respuesta como resultado de la destrucción o inactivación de la molécula emisora de señales combinada con la disminución del estímulo extracelular.

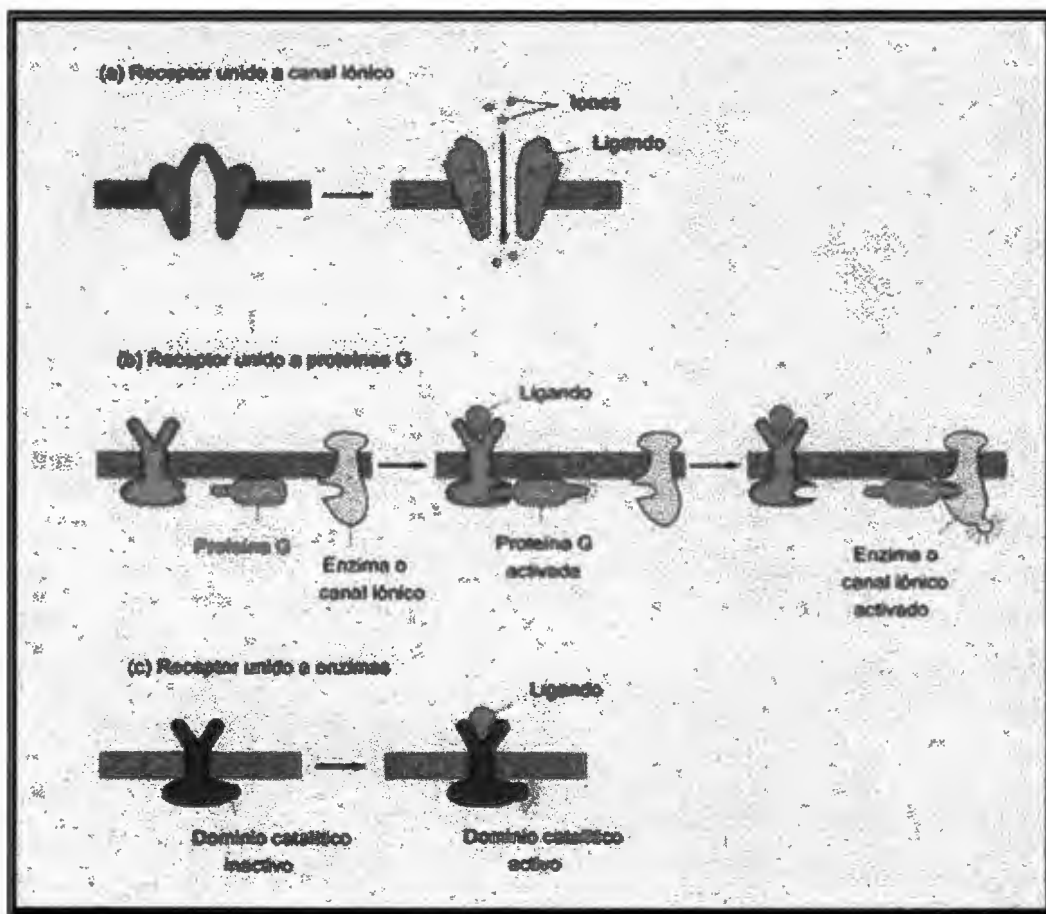


Figura 1. Clases de receptores proteicos de la membrana plasmática
(Alberts y col., 1994).

4. Transducción de señales a través del sistema de fosfoinosítidos

La versatilidad biológica de los fosfoinosítidos está dada a partir de su habilidad única de ser fosforilados reversiblemente en tres posiciones distintas del inositol como grupo cabeza. La fosforilación simple o combinada en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo de inositol pueden generar por lo menos siete diferentes derivados de fosfatidil inositol. La actividad biológica de los fosfoinosítidos puede ser controlada espacialmente por la regulación de las enzimas que los producen (quinasas) o por las que los degradan (fosfatasas y lipasas) (Sato y col., 2001). Los fosfolípidos de inositol son importantes mediadores entre la célula y el ambiente, ya que son fuente de segundos mensajeros y también pueden funcionar como efectores directos en la regulación de la actividad de enzimas membranales (Cho y Boss, 1995; Munnik y col., 1998b).

4.1 Sistema de fosfoinosítidos en animales

El sistema de señalización celular de lípidos de inositol fue detectado por primera vez en 1953 por Hokin, quien observó la incorporación de un isótopo dentro de lípidos. En 1975 Michell sugiere que el recambio de lípidos de inositol es una manifestación de un sistema de señalización intracelular diferente al que se conocía hasta entonces (Irvine, 1990).

4.1.1. Fosfolipasa C (PLC)

Esta fosfolipasa es una fosfodiesterasa que remueve el grupo cabeza unido a un fosfato de los fosfolípidos (Figura 2). Su activación es a través de receptores acoplados a proteínas G o a través de receptores acoplados a tirosin-quinasas. La isoforma PLC- β es controlada por proteínas G y la isoforma PLC- γ depende de receptores acoplados a tirosin-quinasas y otras

isoformas pueden activarse por la elevación de calcio (Ca^{2+}) citosólico (Drøbak, 1993; Munnik y col., 1998b).

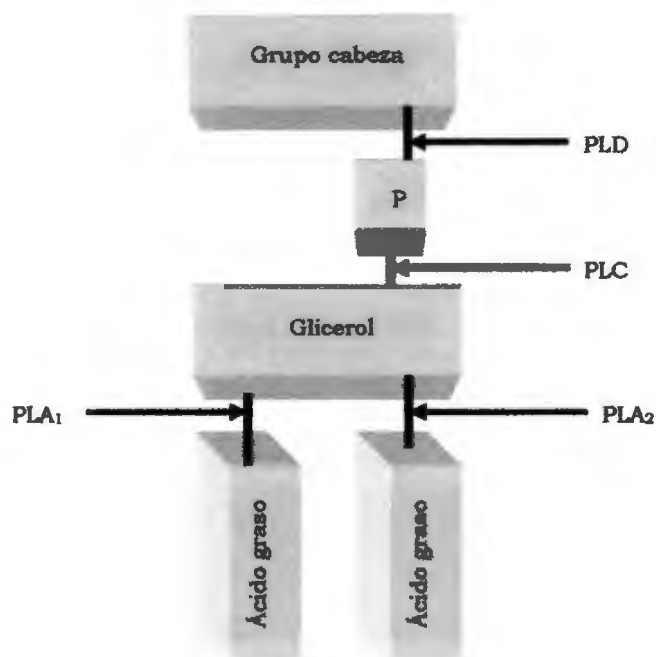


Figura 2. Fosfolipasas asociadas a los fosfolípidos de la membrana plasmática. (Munnik y col., 1998b).

La PLC rompe la unión fosfodiéster del fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PI-4,5-P_2) produciendo dos segundos mensajeros; el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y el 1,2 diacilglicerol (DAG). El IP_3 es soluble en agua y difunde hacia los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , donde induce la liberación de este ión por unión a receptores específicos de IP_3 unidos a canales de Ca^{2+} . El DAG altamente lipofílico permanece en la matriz de la membrana plasmática donde activa a la proteína cinasa C (PKC). Dos cascadas de señalización son iniciadas involucrando ambas la elevación de Ca^{2+} citosólico, lo que resulta en la modulación de elementos de respuesta sensibles a Ca^{2+} y en la fosforilación de proteínas (Drøbak, 1992, 1993) (Figura 3).

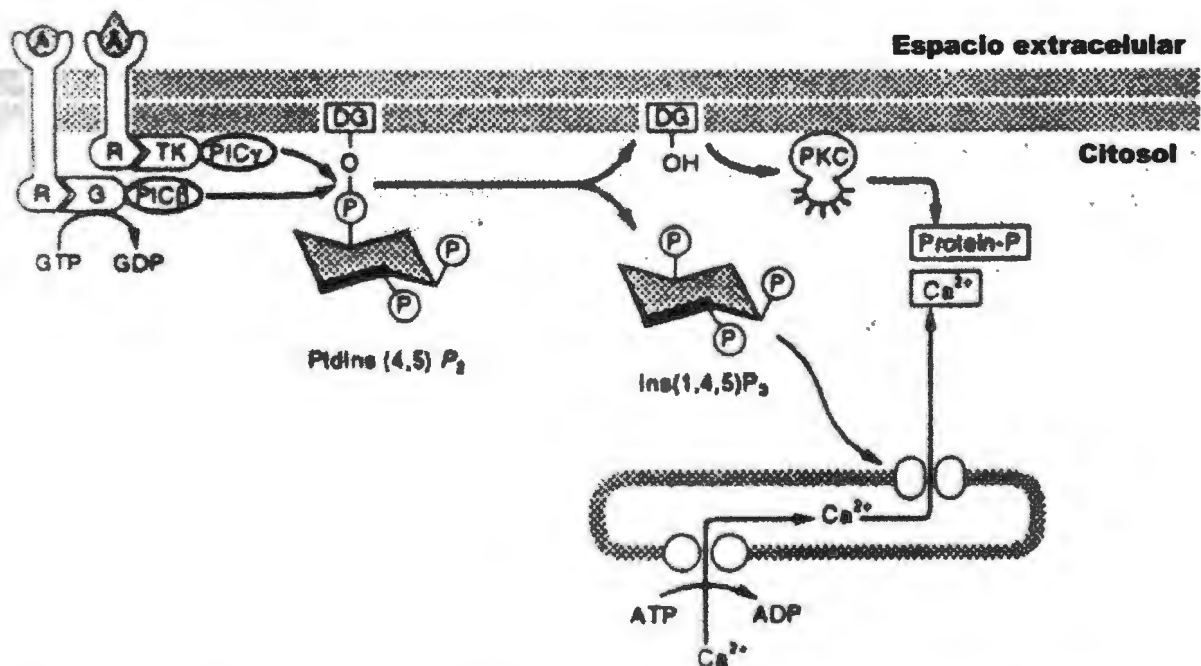


Figura 3. Sistema de fosfoinosítidos en células animales (Drøbak, 1993).

(A) agonista, (R) receptor, (TK) tirosin-cinasa, (G) proteína G, (PLC) fosfolipasa C, (PKC) proteína cinasa C.

El sistema de fosfoinosítidos que involucra a la PLC está ampliamente documentado en células animales, también existen otros sistemas que involucran enzimas que metabolizan estos fosfolípidos.

4.1.2 Fosfolipasa A (PLA)

La fosfolipasa A (PLA) es una acilhidrolasa que cataliza la hidrólisis de la unión ester-acil del glicerofosfolípido (Figura 2), resultando en la formación de liso-fosfolípidos y ácidos grasos libres. Es activada en respuesta a hormonas, factores de crecimiento y agonistas relacionados. Se conocen las isoformas 1 y 2, de las cuales únicamente la PLA₂ está implicada en la transducción de señales (Munnik y col., 1998b).

4.1.3 Fosfolipasa D (PLD)

La fosfolipasa D (PLD) rompe la unión diéster-fosfato terminal (Figura 2) y permite la formación de ácido fosfatídico (PA) y un grupo cabeza libre. Esta fosfolipasa controla múltiples procesos celulares como la acción hormonal, la organización del citoesqueleto, respuestas de defensa, la diferenciación y la reproducción. (Munnik y col., 1998b; Wang, 1999).

4.1.4 Fosfatidil inositol 3 fosfato (PI 3P)

A este fosfolípido se le ha relacionado con cambios en la morfología de la vacuola, con la vía de endocitosis y con el transporte de proteínas del aparato de Golgi a los lisosomas. Es producido por la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI 3K) de la clase III (Rameh y Cantley, 1999).

4.1.5 Fosfatidil inositol 4 fosfato (PI 4P)

El PI 4P activa la polimerización de actina, regula la actividad de la casein cinasa I, de la proteína cinasa sinaptosomal, de la ATPasa de sodio-potasio, de la ATPasa de calcio y de la ATPasa sensible a vanadato. Es producido por la fosfatidil inositol 4 cinasa (PI 4K) (Drøbak, 1993; Yang y col., 1993).

4.1.6 Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 P₂)

Este fosfolípido interactúa con muchas proteínas unidas a actina como profilina, gelsolina, α -actinina y cofilina. Su recambio es importante para la endocitosis de receptores acoplados a proteínas G. Regula el transporte de iones, ya que modula la actividad de proteínas integrales de membrana, como las ATPasas tipo P y los canales de K⁺ sensibles a ATP (Stevenson y col., 2000).

4.1.7 Ácido fosfatídico (PA)

El PA puede regular la actividad de proteínas-quinasas (como la PKC), proteínas unidas a GTP, el ensamble de actina, la mitogénesis, el movimiento de vesículas y la PLC. Recientemente se ha demostrado que este fosfoinosítido es un componente importante en la vía de señalización de mTOR (por sus siglas en inglés “mammalian target of rapamycin”) y en la síntesis de proteínas (Munnik y col., 1998b; Wang, 1999; Fang y col., 2001).

4.1.8 Liso-Fosfolípidos (LP)

Los liso-fosfolípidos regulan procesos fundamentales como la angiogénesis, el origen de tumores, la inmunidad, la arteroesclerosis y la sobrevivencia neuronal. Los liso-fosfolípidos pueden ser precursores del factor activador de plaquetas y los ácidos grasos pueden activar diferentes tipos de canales de potasio (K^+). Entre los LP se encuentran la liso fosfatidilcolina que está asociada a la modificación oxidativa de lipoproteínas y el ácido lisofosfatídico que se encuentra asociado a la albúmina sérica en el plasma (Munnik y col., 1998b; Hla y col., 2001).

4.2 Sistema de fosfoinosítidos en plantas

Se ha encontrado que muchos de los componentes del sistema de fosfoinosítidos en animales tienen equivalentes funcionales y/o estructurales en las células vegetales. Los fosfoinosítidos son los principales fosfolípidos en las células vegetales y pueden constituir del 15 al 20 por ciento del total de los fosfolípidos de la membrana plasmática y de la membrana mitocondrial externa. Los polifosfoinosítidos: PI 4P y el PI-4,5-P₂ constituyen del 1 al 2 por ciento en la membrana. Se han caracterizado tanto cinasas como fosfatasa de fosfoinosítidos en las membranas plasmáticas vegetales (Drøbak, 1992; Munnik y col., 1998b; Stevenson y col., 2000).

4.2.1. Fosfolipasa C (PLC)

Se han identificado dos tipos principales de PLC en vegetales. La tipo I es una enzima soluble que requiere niveles milimolares de Ca^{2+} y prefiere como sustrato al fosfatidil inositol entre otros fosfoinosítidos. La PLC tipo II esta asociada predominantemente con la membrana plasmática, requiere niveles micromolares de Ca^{2+} y presenta mayor afinidad a polifosfoinosítidos. Por lo anterior, se considera que la PLC tipo II está más relacionada con las funciones de isoformas animales y las funciones de la PLC tipo I permanecen desconocidas (Drøbak, 1993).

El DAG producido por esta fosfolipasa activa a la PKC; sin embargo, no se ha encontrado un equivalente directo de la PKC en las células vegetales, aunque se sugiere que otras proteína-quinasas pueden tener funciones equivalentes a la PKC de animales (Drøbak, 1993). En plantas se ha demostrado que el IP_3 , producto también de la PLC, causa la liberación de Ca^{2+} de vesículas membranales de raíces de zanahoria y avena (Ettlenger y Lehle, 1988) y que las oscilaciones de Ca^{2+} mediadas por IP_3 están involucradas en respuestas de crecimiento (Stevenson y col., 2000).

4.2.2 Fosfolipasa A (PLA)

Esta enzima ha sido relacionada con respuestas de heridas y de crecimiento. En *Ricinus communis* ha sido implicada en la remoción selectiva de ácidos grasos inusuales de fosfolípidos del retículo endoplásmico. La actividad de la PLA es un mecanismo para canalizar los ácidos grasos inusuales a triacilglicerolos en semillas de oleaginosas, previniendo un daño por acumulación de estos ácidos grasos. Además, es activada por auxinas en respuestas de crecimiento (Chapman, 1998).

4.2.3 Fosfolipasa D (PLD)

La PLD ha sido asociada con la germinación de semillas, senescencia y maduración. Esta fosfolipasa cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina, en respuesta a luz, temperatura, hormonas y patógenos. Su producto, el PA, puede ser fosfohidrolizado y convertido a diacilglicerol (DAG) que activa a la PKC o directamente puede activar a la PLC y estimular la monogalactosildiacilglicerol sintasa en plántulas de pepino (Wang y col., 1994; Chapman, 1998; Munnik y col., 1998b).

4.2.4 Fosfatidil inositol 3 fosfato (PI 3P)

El PI 3P es el producto de la PI 3 K, no se ha podido aislar en células vegetales, sin embargo, el PI 3P sí ha sido localizado en nódulos durante la fijación del nitrógeno (Stevenson y col., 2000).

4.2.5 Fosfatidil inositol 4 fosfato (PI 4P)

El PI 4P es importante para la biogénesis de la membrana y el movimiento de vesículas desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Stevenson y col., 2000). En plantas modula la actividad *in vitro* de la ATPasa de la membrana plasmática sensible a vanadato. Otro papel sugerido para el PI 4P es el de incrementar la actividad de una isoforma de la polimerasa de ADN α (Drøbak, 1993). La actividad de PI 4K, enzima que lo forma, es necesaria para la formación de vesículas y estimula la secreción de catecolaminas en células fotosintéticas (Stevenson y col., 2000). Se ha propuesto que la estimulación de la PI 4K con factores de crecimiento, aumenta la concentración de PI 4P celular y se encuentra asociada al citoesqueleto (Drøbak, 1993).

4.2.6 Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 P₂)

El PI 4,5P₂ es importante para la regulación del citoesqueleto dinámico, para el movimiento de vesículas y para el transporte de iones; además de ser el precursor de los segundos mensajeros IP₃ y DAG, tiene un papel importante en la señalización (Stevenson y col., 2000).

4.2.7 Ácido fosfatídico (PA)

En plantas, la función de este fosfoinosítido como segundo mensajero no ha sido establecida; sin embargo, el PA es producido por algunos tejidos vegetales cuando son tratados con ácido abscísico y en ausencia de esta hormona el PA mimetiza la acción del mismo. Este fosfoinosítido también ha sido encontrado en las vías de señalización inducidas por heridas y por patógenos (van der Luit y col., 2000; Frank y col., 2000)

4.2.8 Liso – Fosfolípidos (LP)

Los lisofosfolípidos estimulan la ATPasa de protones y la bomba de protones en membranas de avena; en coleóptilos de maíz el ácido lisofosfatídico incrementa la acidificación del apoplasto y la elongación, además estimula el crecimiento de hipocótilos de calabaza etiolados (Munnik y col., 1998b).

5. Metabolismo de inositol y derivados de inositol

En la Figura 4 se presenta el metabolismo de los fosfoinosítidos indicando las enzimas identificadas en plantas y animales.

5.1 Fosfatidil inositol 3 fosfato (PI 3P)

Es formado por fosforilación en la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidil inositol por acción de la PI 3K. Este además puede ser fosforilado posteriormente por una fosfatidil inositol 5 cinasa (PI 5K), para formar el fosfatidil inositol 3,5 bifosfato (PI 3,5P₂) o por una fosfatidil inositol 4 cinasa (PI 4K), dando como producto el fosfatidil inositol 3,4 bifosfato (PI 3,4P₂). O bien puede ser defosforilado por una fosfatasa para formar nuevamente el fosfatidil inositol (Figura 4) (Chan y col., 1999; Stevenson y col., 2000).

5.2 Fosfatidil inositol 4 fosfato (PI 4P)

La fosforilación en la posición 4 del anillo de inositol del fosfatidil inositol por la PI 4K produce el PI 4P. El PI 4P puede ser fosforilado posteriormente por una PI 3K o por una PI 5K, para formar el fosfatidil inositol 3,4 bifosfato (PI 3,4P₂) o el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5P₂) respectivamente. También puede ser defosforilado por una fosfatasa para formar nuevamente el fosfatidil inositol (Figura 4) (Munnik y col., 1998b; Chan y col., 1999; Stevenson y col., 2000).

5.3 Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 P₂)

Este fosfolípido es sintetizado por fosforilación secuencial en las posiciones 4 y 5 del fosfatidil inositol por acción de la PI 4K y la fosfatidil inositol 4 fosfato 5 cinasa (PI4P 5K)(Munnik y col., 1998a). Otra vía de formación propuesta es a partir del fosfatidil inositol 5 fosfato (PI 5P), el cual es posteriormente fosforilado por una PI 4K. El PI 4,5 P₂ puede ser

defosforilado para formar nuevamente PI 4P o PI 5P (Figura 4) (Chan y col., 1999; Meijer y col., 2001).

5.4 Inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) como segundo mensajero

Es bien conocido que la PLC al hidrolizar el PI 4,5P₂ forma IP₃ (Munnik y col., 1998b). Además la defosforilación del ácido fítico (IP₆) que es un almacén de fosfato y contraiones catiónicos en semillas, es mediada por una o más fosfohidrolasas (fitasas), de las cuales existen dos clases la 3-fitasa y la 6- fitasa siendo esta última la forma dominante. Estas enzimas son capaces de defosforilar sucesivamente el IP₆ hasta formar inositol libre. La defosforilación de algunos de estos intermediarios es dependiente de Ca²⁺, siendo el caso del IP₃ (Drøbak, 1992). El IP₃ además puede ser fosforilado para formar nuevamente IP₆ (Munnik y col., 1998b).



5.5 Ácido fosfatídico (PA)

El PA es generado directamente por la PLD e indirectamente a partir de la vía de la PLC que produce DAG el cual es fosforilado por la DAG cinasa (DAGK). Este fosfoinosítido puede ser metabolizado por la ácido fosfatídico fosfatasa (PA fosfatasa) para formar DAG o fosforilado por la ácido fosfatídico cinasa (PAK) para formar DAG pirofosfato (DAGPP), además de generar el ácido lisofosfatídico por acción de la PLA (Figura 5) (Munnik y col., 1995; Munnik y col., 1998b).

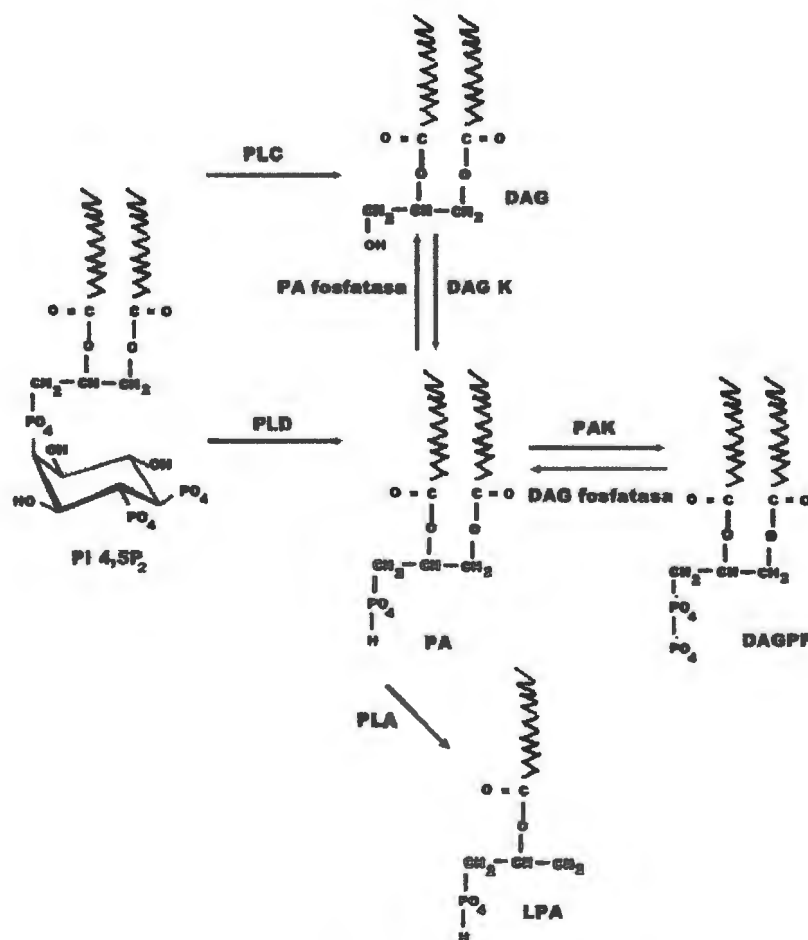


Figura 5. Metabolismo del ácido fosfatídico (Munnik y col., 1995; Munnik y col., 1998b).

5.6 Liso – Fosfolípidos (LP)

Estos fosfoinosítidos son producidos por acción de la PLA sobre los diferentes derivados de fosfatidil inositol (ver Figura 2) (Munnik y col., 1998b).

6. *Vía de Transducción de señales para auxinas*

Numerosas investigaciones han demostrado que la aplicación de auxinas exógenas a las células y órganos vegetales influye de manera importante sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. El mecanismo de acción de estas hormonas ha sido estudiado y se ha propuesto que podrían tener más de una vía de señalización: por la vía de ubiquitina–proteosoma (Walter y Estelle, 1998) y por otra mediada por fosfoinosítidos (Hobbie y col., 1994; Scherer y Arnold, 1997). Aquí se describe la vía que esta asociada con los fosfoinosítidos.

6.1 Receptor

Napier y Venis (1991) han descrito una proteína localizada en la membrana plasmática de maíz que une auxinas y cuyas características indican que puede ser un receptor para estas hormonas. Asimismo, en otros estudios se ha descrito, también en maíz, la unión de las auxinas a una proteína membranar (denominada ABP1 por sus siglas en inglés “Auxin binding protein”), que se ha localizado principalmente en el retículo endoplásmico (Macdonald, 1997) (Figura 6). En hipocótilos de calabaza se han identificado otras ABPs en membrana plasmática, entre las que se encuentran, una proteína de 40 y otra de 42 KDa, presumiblemente, son subunidades de una proteína multimérica integral de membrana, la cual podría tener un sitio de unión de auxinas y poseer una función de transportador o canal (Hicks y col., 1993). Por otra parte, se han encontrado formas solubles de proteínas de unión a auxinas en el núcleo de diferentes

especies, lo que sugiere que esta ABP puede estar involucrada en el control de la expresión genética (Garbers y Simmons, 1994).

6.2 Proteínas G

Diversos estudios indican la participación de las proteínas G en las vías de transducción de señales en plantas mediadas por fosfoinosítidos. Al respecto, se propone, con base en experimentos realizados utilizando un sistema de unión a un análogo no hidrolizable de GTP, que cuatro distintas proteínas G pueden estar presentes en *Lemna paucicostata*, asimismo en microsomas de hipocótilo de *Cucurbita pepo* se han localizado proteínas unidas a GTP. Por otra parte, algunas proteínas de *V. faba*, *A. thaliana* y *C. communis* presentan reacción cruzada con anticuerpos de proteínas G de animales (Einspahr y Thompson, Jr., 1990).

Se sugiere que la proteína ABP1 (posible receptor de auxinas) es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Figura 6). La presencia de proteínas G es demostrada en membranas de coleóptilo de arroz, en donde las auxinas estimulan la unión de un análogo no hidrolizable de GTP (GTP γ S), además, se sabe que las subunidades G α de la proteína G sólo se unen a GTP γ S cuando el ligando (auxinas) se encuentra unido a su receptor, asimismo, el péptido C-terminal de ABP1 es capaz de estimular la unión de GTP γ S a membranas microsomales de maíz (Macdonald, 1997).

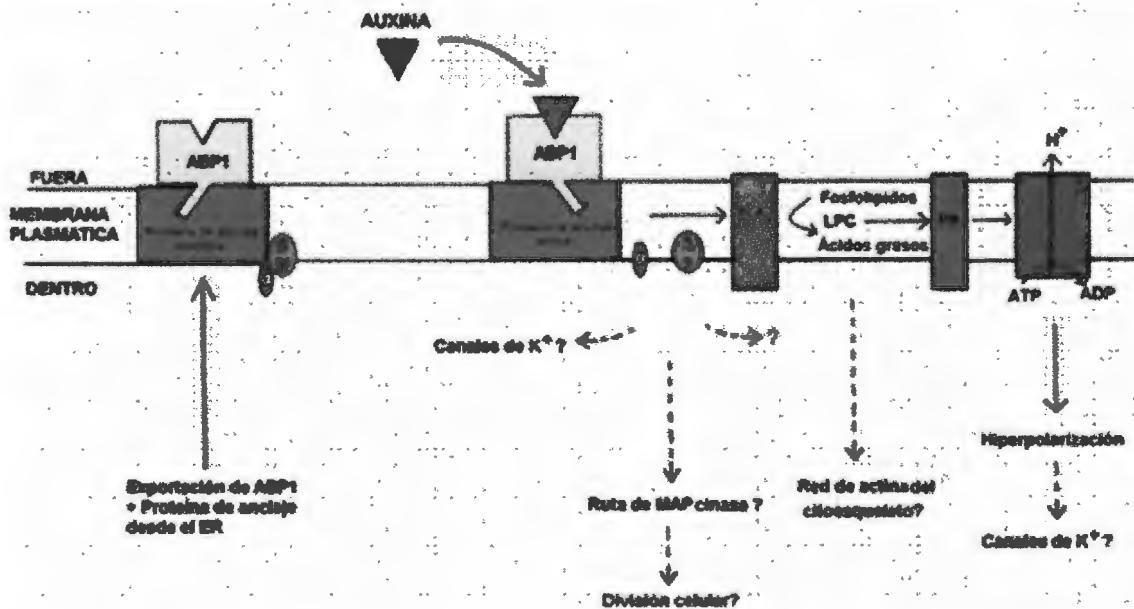


Figura 6. Vía de transducción propuesta para auxinas (Macdonald, 1997).

6.3 Efectos de auxinas en fosfolipasas, niveles de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y otros fosfolípidos derivados de inositol

En la vía de transducción de auxinas se ha involucrado a las fosfolipasas, específicamente a la PLA_2 (Munnik y col., 1998b). El crecimiento de hipocótilos por la aplicación de auxinas está asociado con una rápida activación de la PLA_2 . En microsomas de células de soya se demostró que la activación de esta fosfolipasa está mediada por un receptor y regulada por nucleótidos de guanina (Chapman, 1998). Se propone que los lisofosfolípidos producidos por la acción de la PLA_2 pueden actuar como segundos mensajeros en un sistema estimulado por auxinas, ya que pueden activar a las proteína-quinasas y a la ATPasa de protones localizadas en la membrana plasmática (Macdonald, 1997). La aplicación de inhibidores de la PLA_2 reducen en un cincuenta por ciento el crecimiento inducido por auxinas en hipocótilos de *C. Pepo* (Scherer y Arnold, 1997).

Además, se ha reportado que las auxinas generan cambios transitorios en los niveles de IP_3 y en el inositol bifosfato (IP_2) en células en cultivo de *Catharanthus roseus* (Ettlenger y Lehle, 1988), lo que hace suponer la participación de la PLC (Einspahr y Thompson, Jr., 1990).

En plantas se ha demostrado que el IP_3 causa la liberación de Ca^{2+} de vesículas membranales de raíces de zanahoria y avena (Ettlenger y Lehle, 1988) y que las oscilaciones de Ca^{2+} mediadas por IP_3 están involucradas en respuestas de crecimiento (Stevenson y col., 2000).

Por otra parte, la participación de la PLD y el PA en la regulación de la traducción de ARNm 5' TOP en la respuesta a mitógenos en células de mamíferos y las evidencias de la participación de las auxinas en la regulación de la traducción de ARNm 5' TOP sugieren la participación de este fosfoinosítido en el mecanismo de acción de estas hormonas (Fang y col., 2000)

JUSTIFICACIÓN

En animales la vía de señalización de fosfoinosítidos es una de las más importantes ya que permite convertir la información extracelular en respuestas intracelulares a corto y largo plazo, con la participación de proteín-cinasas, fosfolipasas y fosfatasas. En vegetales se propone la existencia de una vía de señalización similar, ya que se han identificado fosfatasas, fosfolipasas y proteín-cinasas que producen segundos mensajeros del sistema de fosfoinosítidos que estarían involucrados en la regulación de distintos procesos (por ejemplo la traducción) en respuesta a señales externas como las hormonas.

HIPÓTESIS

Las auxinas son hormonas vegetales promotoras del crecimiento, si son aplicadas de manera exógena pueden producir diferentes respuestas fisiológicas dependiendo de la concentración y del tejido en donde son aplicadas.

Si su mecanismo de acción depende de la vía de señalización mediada por fosfoinosítidos, se esperaría que al aplicar auxinas de manera exógena a los ejes embrionarios completos, raíces y parte aérea del eje embrionario de maíz, cambie la proporción de fosfolípidos presentes en las membranas aumentando las moléculas correspondientes a los segundos mensajeros de esta vía de señalización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Profundizar en el conocimiento de la(s) vía(s) de transducción de señales inducida por auxinas (natural y sintéticas) en maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los derivados fosforilados de fosfatidil inositol en ejes embrionarios de maíz imbibidos por diferentes periodos con y sin auxinas (natural y sintéticas).
- Identificar los derivados fosforilados de fosfatidil inositol en coleóptilos de maíz tratados y sin tratar con auxinas (natural y sintéticas).
- Identificar los derivados fosforilados de fosfatidil inositol en raíces de maíz tratadas y sin tratar con auxinas (natural y sintéticas).
- Comparar la cinética de aparición de los productos de la(s) vía(s) de transducción inducida por las auxinas (natural y sintéticas) en diferentes tejidos de maíz.

METODOLOGÍA

1. Material biológico

a) Obtención de ejes embrionarios completos, raíz y parte aérea del eje embrionario.

Se usaron granos de maíz (*Zea mays* L. var. Chalqueño). Los granos de maíz fueron desinfectados superficialmente mediante un lavado con etanol al 70 % v/v por 15 seg., a continuación se enjuagaron con agua estéril y se trataron por 10 min. con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % v/v y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Posteriormente los granos se imbibieron en algodón humedecido con agua estéril, a 25 °C por 23 o 47 hr. y se disectaron ya sea los ejes embrionarios completos o las raíces y la parte aérea del eje embrionario.

Los distintos tejidos disectados se sometieron a un tratamiento de un pulso de auxinas, incubándose por una hora más en una solución acuosa con o sin 200 μ M de las auxinas estudiadas (ácido indol-3-acético (AIA), ácido 3,6 dicloro o-anísico (DICAMBA), α -ácido 1-naftalenacético (α -ANA) y del análogo inactivo β -ácido 1-naftalenacético (β -ANA). Debido a que la imbibición en agua fue por 23 y 47 hr. y se dio un tratamiento de 60 min., a estos tratamientos se les denominará de 24 y 48 hr. respectivamente.

Después de la incubación, los tejidos se lavaron tres veces con agua estéril, se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

b) Obtención de la parte aérea del eje embrionario en diferentes etapas de desarrollo.

Los granos se desinfestaron inicialmente con el método antes mencionado y posteriormente fueron imbibidos en algodón humedecido con agua estéril, a 25 °C. El desarrollo de los granos se siguió y una vez alcanzada la etapa deseada para la parte aérea del eje, ésta se disectó. Las etapas de desarrollo de la parte aérea seleccionadas fueron:

- a) Sin emerger. Los granos se imbibieron por 30 hr. y se seleccionaron aquellos en los cuales la radícula no había emergido.
- b) Recién emergida. Los granos se imbibieron por 36 hr. y se seleccionaron aquellos que ya habían germinado y la parte aérea se encontraba recién emergida.
- c) 1 cm de longitud. Los granos se imbibieron por 50 hr. y se seleccionaron aquellos que ya habían germinado y en los que la parte aérea emergida media 1cm.

Por otra parte, se realizó un estudio cinético de la respuesta a auxinas en la parte aérea recién emergida, en las que se aplicó un tratamiento de auxinas (200 μ M) por 5, 10, 20, 30 y 60 min.

Los tejidos disectados de cada etapa de desarrollo, después de la incubación con auxinas, se lavaron tres veces con agua estéril, se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

2. Obtención de membranas microsomales

Cada tejido se homogenizó en un mortero pre-enfriado con amortiguador (Sacarosa 250mM, EDTA 3mM, EGTA 2mM, 2-mercaptoetanol 14mM, DTT 2mM, Tris-HCl 30mM pH 7.4) en una proporción de tres volúmenes por gramo de tejido, agregando 0.1g de polivinil polipirrolidona insoluble. El tejido se filtró a través de cuatro

capas de gasa, se centrifugó a 5000 g por 10 min. a 4°C, se desechó la pastilla y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 40 000 g por 1 hr. a 4°C para obtener la pastilla de microsomas, la cual se pesó y se resuspendió en amortiguador (3 volúmenes/g de microsomas) (Cho y Boss, 1995; Perera y col., 1999).

3. Extracción de los derivados fosforilados de fosfatidil inositol

Se tomaron 100 µL de microsomas resuspendidos a los cuales se les agregó 1500 µL de una mezcla de cloroformo/metanol (1:2 v/v) fría, se agitó en el vórtex, se colocó en hielo por 30 min. y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). A continuación se adicionaron 500 µL de EDTA 100mM pH 4.4, 500 µL de HCl 2.4N y 500µL de cloroformo, agitando en vórtex después de cada adición. La mezcla se centrifugó a 2000g por 6 min. a 4°C, la fase inferior fue separada y la fase superior se extrajo dos veces más con 500 µL de cloroformo separándose por centrifugación como se indicó anteriormente. Todas las fases inferiores colectadas se combinaron y se lavaron dos veces con 2000 µL de metanol/HCl 1N (1:1 v/v), centrifugando a 2000 g por 6 min. a 4°C. Las fases inferiores obtenidas después de cada centrifugación, las cuales contenían los fosfolípidos, se combinaron, se secaron con vacío y se almacenaron en una atmósfera inerte de N₂ gaseoso a -70 °C hasta su uso (Cho y Boss, 1995; Perera y col., 1999).

4. Separación y cuantificación de los derivados fosforilados de fosfatidil inositol

Los fosfolípidos se solubilizaron en una mezcla cloroformo / metanol (2:1 v/v) y se separaron mediante cromatografía en capa fina usando placas de silica gel LK5D (Whatman), eluyendo con una mezcla de:

cloroformo/metanol/hidróxido de amonio/agua (86:76:6:16 v/v/v/v), se usaron como estándares PI, PI 4P, PI 4,5P₂ y PA. Los fosfolípidos separados en la placa de cromatografía se visualizaron mediante una tinción con yodo (Perera y col., 1999).

5. Cuantificación de Inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃)

La cuantificación de IP₃ se realizó en la parte aérea del eje embrionario en diferentes etapas de desarrollo y en la recién emergida, estimulada con auxinas por diferentes periodos.

El tejido se pulverizó con N₂ líquido y se añadió a un tubo que contenía 50 µL de una solución fría de ácido perclórico (20% v/v), se incubó en hielo por 20 min. y se centrifugó a 2000 g por 15 min. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se le adicionó un indicador colorimétrico y se ajustó el pH a 7.5 con una solución de hidróxido de potasio 1.5M / Hepes 60mM. Para la cuantificación de IP₃ se utilizó un ensayo comercial por radioinmuno-análisis, el cual se basa en el desplazamiento de la unión del [³H] IP₃ al receptor por el IP₃ presente en las muestras analizadas (Amersham Pharmacia No. Cat. TRK 1000) (Perera y col., 1999).

6. Extracción y Separación de derivados fosforilados de inositol utilizando [γ - ³²P] ATP

La separación de los fosfoinosítidos de las membranas se llevó a cabo utilizando 100µg de proteína contenida en las membranas microsomales en 100µL de una mezcla de reacción (Hepes 50mM pH 7.3, EDTA 1mM, MgCl₂ 10mM, vanadato sódico 0.2mM, DTT 0.5mM y [γ - ³²P] ATP (actividad específica 300cpm/pmol)). Esta mezcla se incubó 5 min. a 30°C y la reacción se detuvo agregando 1.5 mL de una mezcla de

cloroformo/metanol (1:2 v/v) fría. La extracción de los lípidos se realizó agregando 500 μ L de HCl 2.4N y 500 μ L de cloroformo, se agitó en vórtex por 30 segundos, la fase inferior fue extraída y a la fase superior se le añadió 1000 μ L de cloroformo, se agitó nuevamente en vórtex por 30 seg. y se extrajo la fase inferior. Las fases inferiores extraídas fueron combinadas y se les agrego 2000 μ L de una mezcla de metanol/HCl 1N (1:1 v/v), se agitó en vórtex y se separó la fase inferior, la cual se dejó secar a temperatura ambiente por una noche. Los lípidos obtenidos fueron resuspendidos en una mezcla de cloroformo/metanol (9:1 v/v) y separados en placas de silica gel 25TLC (Merck, 0B033695) utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo / metanol / acetona / ácido acético / agua (40:14:15:12:7 v/v/v/v/v).

RESULTADOS

En los ejes embrionarios de granos sin imbibir se detectaron únicamente PIP_2 y PA. A las 24 hr. de imbibición, en los que se alcanzó un 25 % de germinación se siguen detectando PIP_2 y PA y además aparece PI, el cual se encuentra en menor cantidad con respecto a los otros fosfoinosítidos. A las 48 hr. de imbibición, en los que se alcanzó un 80 % de germinación se detectaron los mismos fosfoinosítidos encontrados a las 24 hr. de germinación (Figura 7).

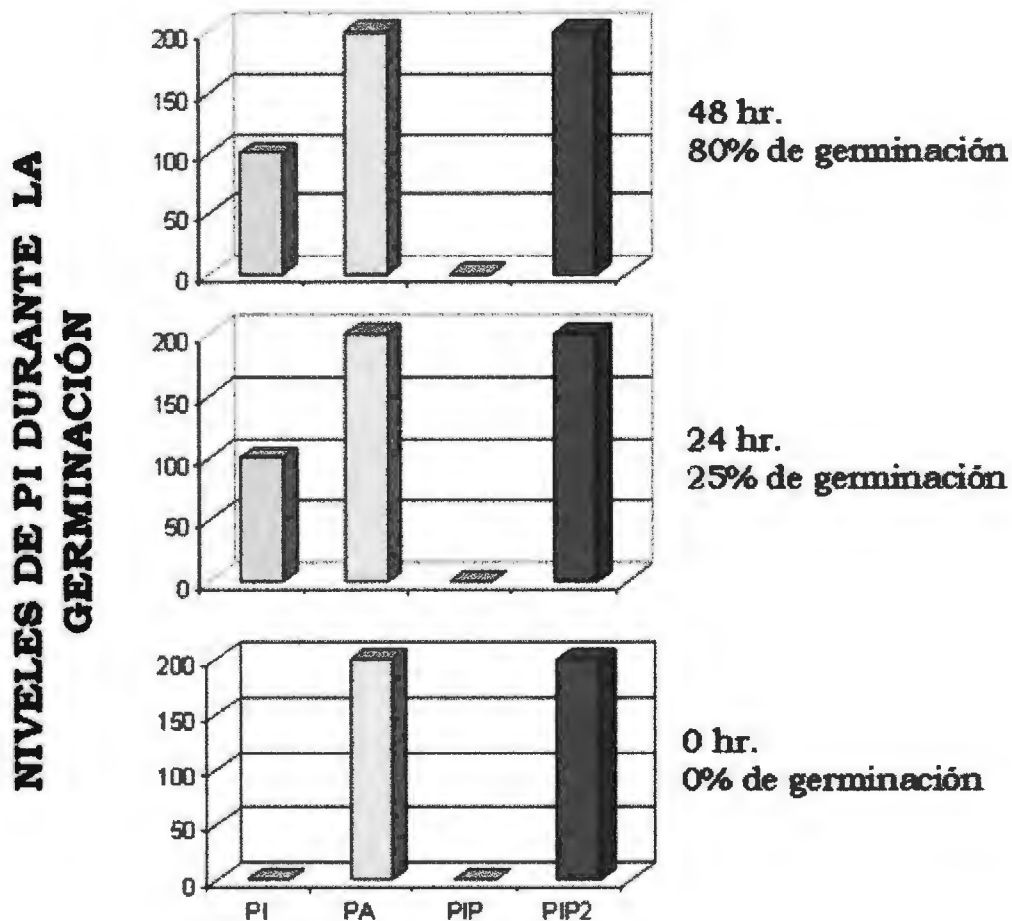


Figura 7. Fosfoinosítidos presentes en ejes embrionarios completos durante la imbibición de granos de maíz en agua.

Al aplicar un tratamiento de una hora con las auxinas AIA ó DICAMBA a los ejes embrionarios de granos imbibidos por 24 hr. se observó que ninguna de las auxinas tuvieron efecto sobre la presencia de los fosfolípidos; excepto en el caso de la auxina sintética DICAMBA que disminuye los niveles de PA con respecto al testigo (Figura 8).

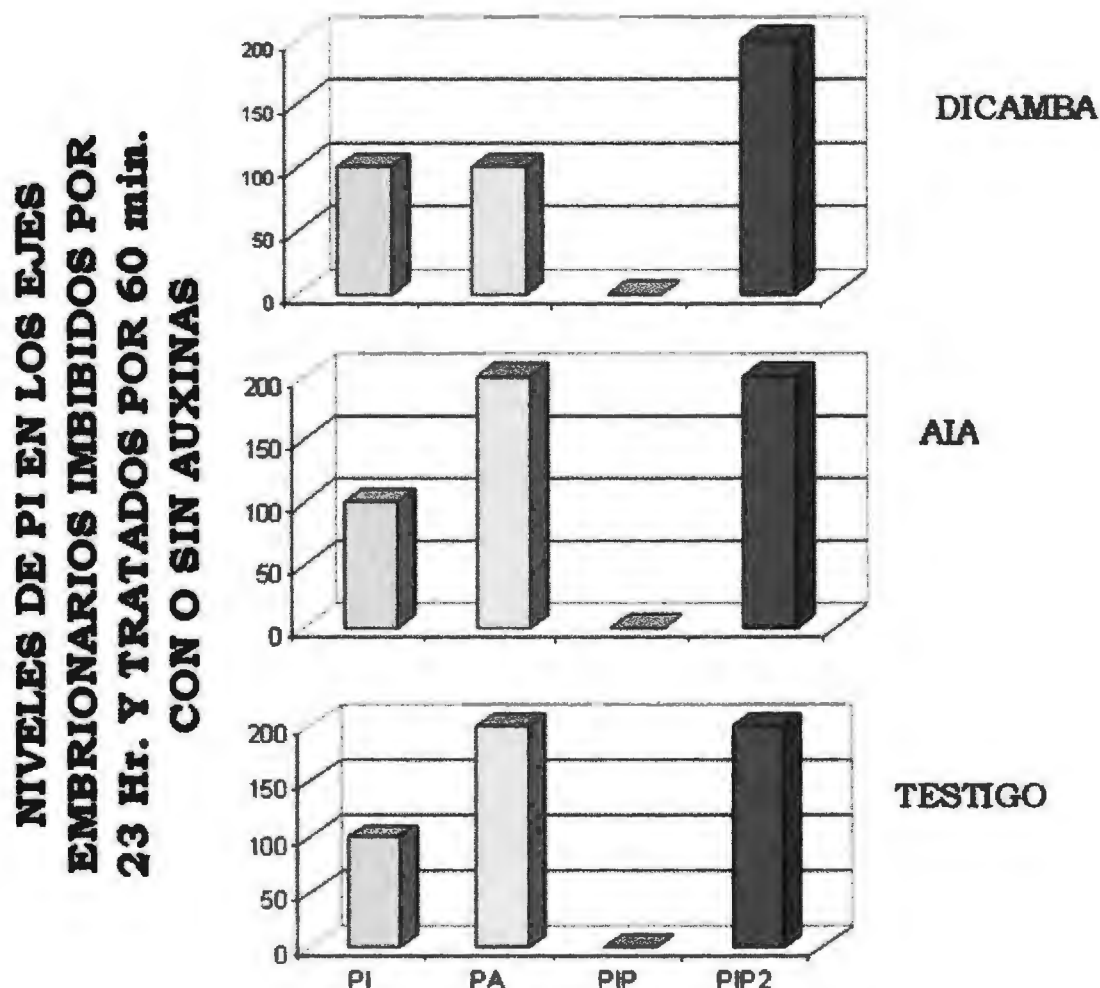


Figura 8. Fosfoinosítidos presentes en ejes embrionarios completos imbibidos por 23 hr. en agua y tratados a este tiempo por 60min. con auxinas.

En los ejes embrionarios de granos imbibidos por 48 hr. se detectaron, como se indicó anteriormente, los fosfoinosítidos PIP₂, PA, y PI. La aplicación de un tratamiento de una hora con las auxinas AIA y DICAMBA no alteró cualitativamente los fosfoinosítidos detectados. Sin embargo, la auxina natural AIA provocó una disminución en los niveles de PA (Figura 9).

**NIVELES DE PI EN LOS EJES
EMBRIONARIOS IMBIBIDOS POR
47 Hr. Y TRATADOS POR 60 min.
CON O SIN AUXINAS**

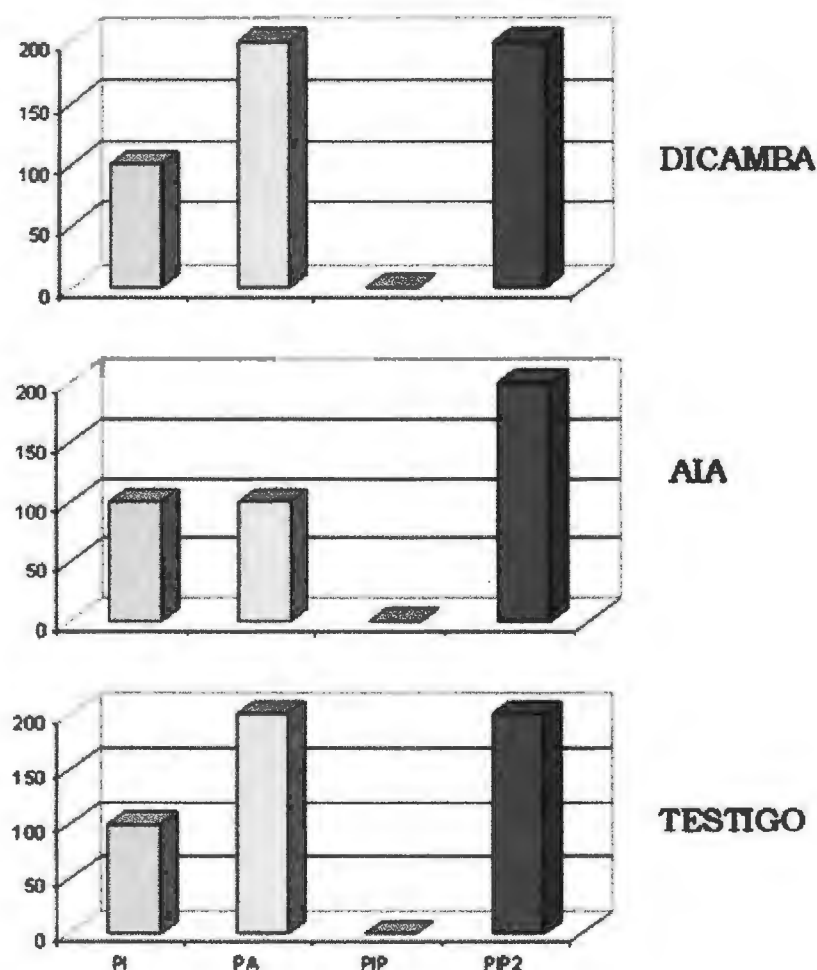


Figura 9. Fosfoinosítidos presentes en ejes embrionarios completos imbibidos por 47 hr. en agua y tratados a este tiempo por 60min. con auxinas.

En las radículas de granos imbibidos por 24 y 48 hr. se observó que las auxinas natural y sintéticas disminuyeron los niveles de PI con respecto al testigo a las 24 hr.; mientras que a las 48 hr. de imbibición sólo el análogo inactivo (β -ANA) tuvo este efecto (Figura 10).

**NIVELES DE PI EN LAS RADÍCULAS DE GRANOS
IMBIBIDOS POR 24 Y 48 HR. CON O SIN AUXINAS**

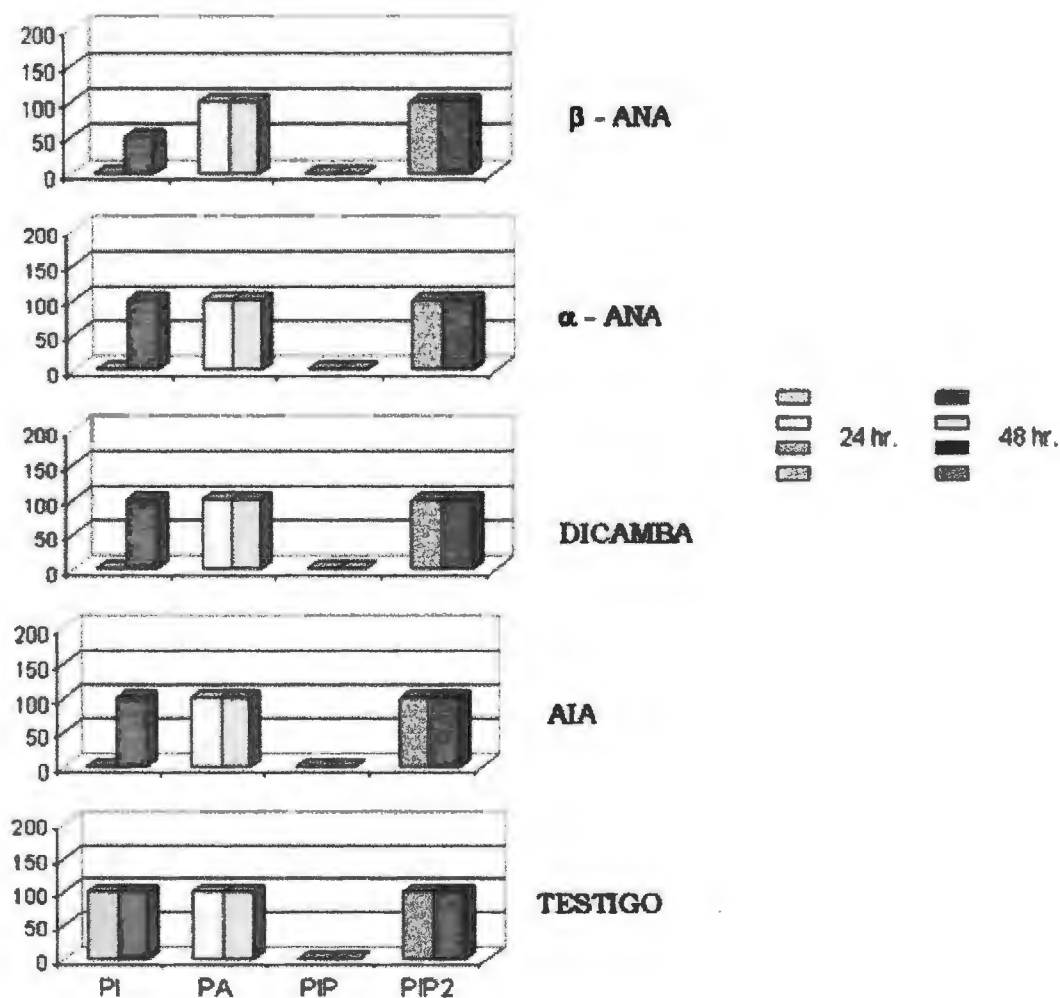


Figura 10. Fosfoinosítidos presentes en las radículas de granos de maíz imbibidos por 23 y 47 hr. y tratados por 60min. con y sin auxinas.

En la parte aérea de granos imbibidos se observó que a las 24 hr, no se logró detectar PI ni en el testigo, ni en el tejido tratado con auxinas; mientras que a las 48 hr. sí se detectó este fosfoinosítido y la auxina sintética DICAMBA incrementó sus niveles con respecto al testigo. Los niveles de PA fueron disminuidos a las 24 hr. por el α -ANA y a las 48 hr. por la auxina natural AIA. Por otra parte, en la parte aérea, de granos imbibidos por 48 hr. se logró detectar PIP en presencia de las auxinas α -ANA y AIA, un fosfoinosítido que no se había detectado en los otros tejidos analizados (Figura 11).

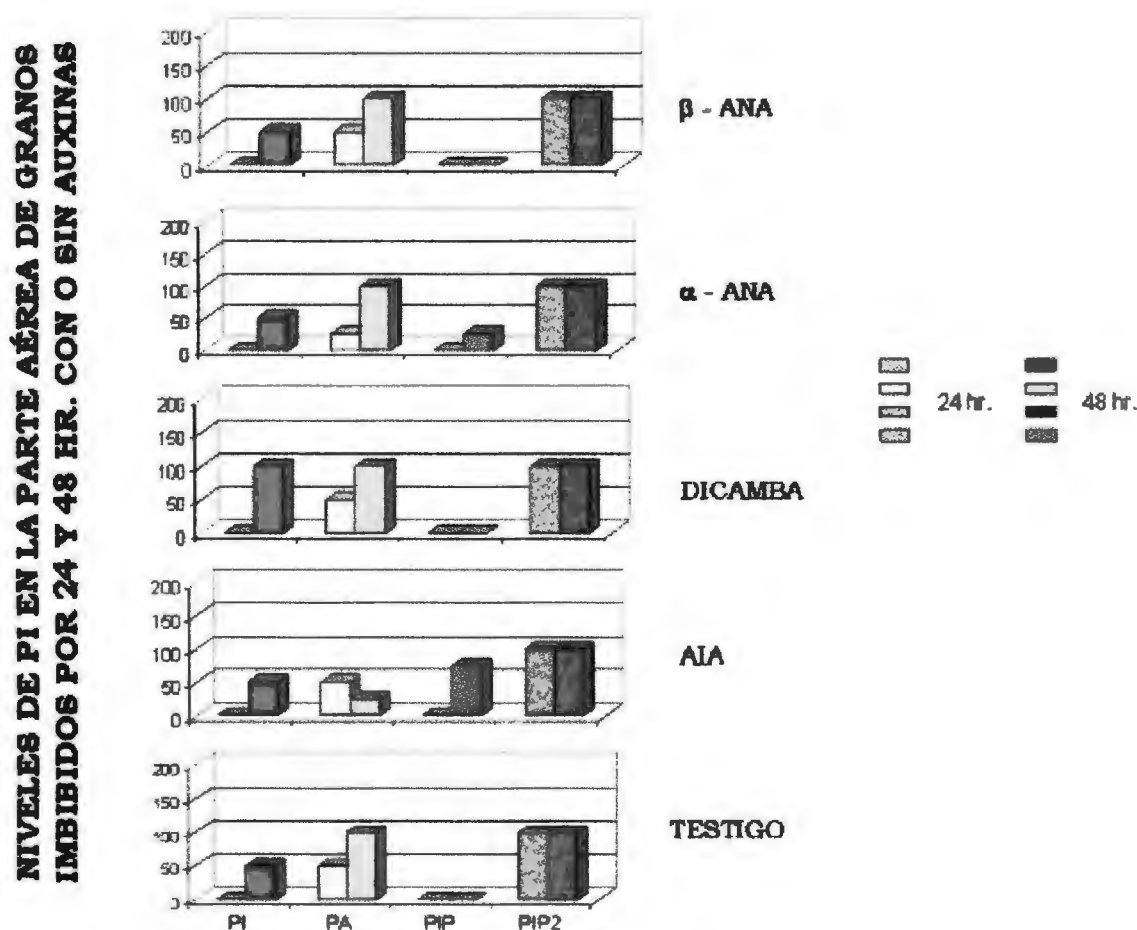
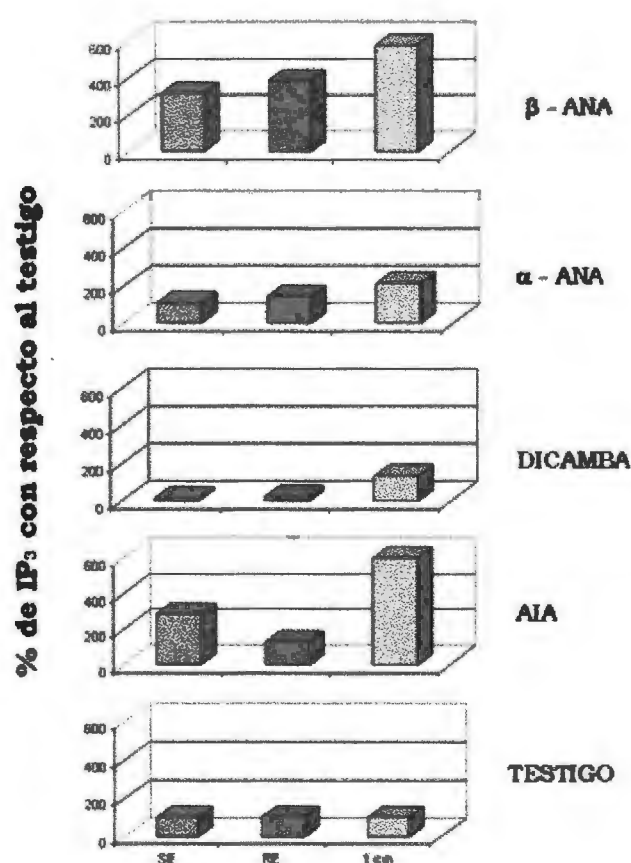


Figura 11. Fosfoinosítidos presentes en la parte aérea de granos imbibidos por 23 y 47 hr. y tratados por 60 min. con y sin auxinas.

Resultados preliminares de los niveles de IP_3 en la parte aérea de granos en distintas etapas de desarrollo: sin emerger (SE), recién emergida (RE) y de un centímetro de longitud (1 cm) imbibidas en ausencia de auxinas mostraron que en todas las etapas analizadas, los niveles de IP_3 son similares. En la parte aérea de granos sin emerger se observó que la auxina natural AIA y el análogo inactivo β -ANA provocaron un aumento de aproximadamente 3 veces en los niveles de IP_3 , en tanto que el DICAMBA disminuyó estos niveles y la auxina α -ANA no los alteró. En la parte aérea recién emergida se observó nuevamente que el DICAMBA disminuyó los niveles de IP_3 , las auxinas AIA y α -ANA no modificaron los niveles de IP_3



en relación al testigo, y el análogo inactivo aumentó cuatro veces los niveles de este segundo mensajero. En la parte aérea de 1 cm de longitud se observó con la auxina AIA y el análogo inactivo β -ANA un aumento de seis veces en los niveles de IP_3 con respecto al testigo, la auxina sintética DICAMBA dio valores similares al testigo, mientras que la auxina sintética α -ANA los duplicó (Figura 12).

Figura 12. Niveles de IP_3 de la parte aérea en diferentes etapas de desarrollo, tratada por 60 min. con auxinas con respecto a los niveles de IP_3 del testigo (sin auxinas).

SE sin emerger; RE recién emergido; 1cm de longitud

Al comparar los niveles de IP_3 en la parte aérea de ejes embrionarios recién emergidos, con respecto a la parte aérea de ejes secos, se observó que los niveles de IP_3 se incrementaron aproximadamente en un 200 %, como resultado de la imbibición y del desarrollo del eje embrionario (Figura 13).

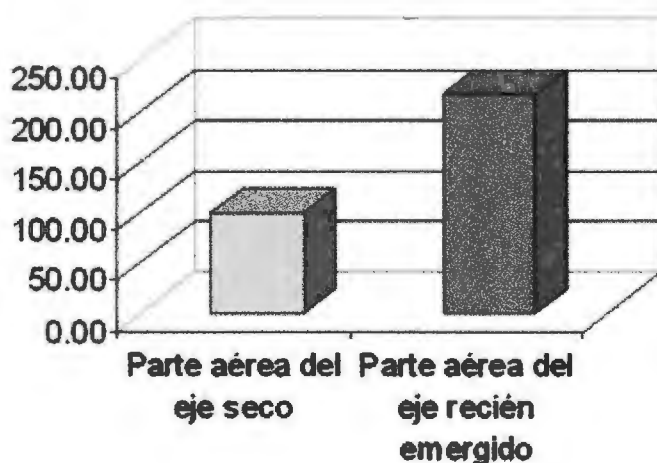


Figura 13. Niveles de IP_3 en la parte aérea de ejes embrionarios secos y en la de ejes embrionarios recién emergidos.

Debido a que no se encontraron efectos específicos de las auxinas en los niveles de IP_3 a 60 min. de tratamiento, se decidió probar pulsos más cortos de auxinas, ya que si estos fosfolípidos están funcionando como segundos mensajeros deben presentar cambios a tiempos cortos.

Al realizar el estudio cinético (0 a 60 min.) de los niveles de IP_3 , en la parte aérea de ejes embrionarios recién emergidos tratados y sin tratar con las auxinas, se observó que en la parte aérea de ejes imbibidos en agua (testigo) se presentó un pico en los niveles de IP_3 a los 10 min. con respecto a la parte aérea recién disectada sin imbibir (0 min.) (Figura 14).

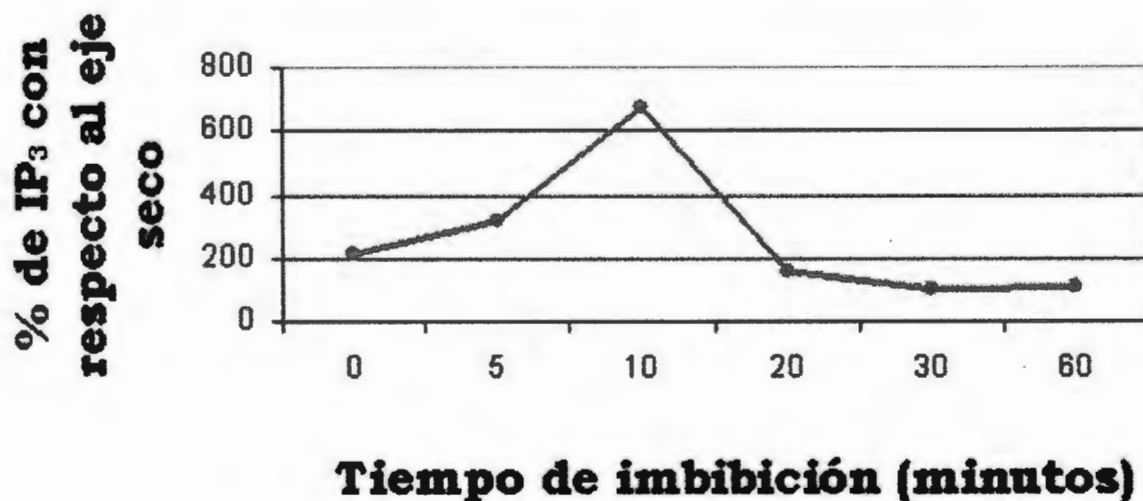


Figura 14. Niveles de IP₃ en la parte aérea de ejes embrionarios recién emergidos a diferentes tiempos de imbibición con agua (testigo).

La incubación en presencia de la auxina natural AIA no produjo este incremento en los niveles de IP₃. Las auxinas sintéticas indujeron un incremento muy ligero en los niveles de IP₃ mucho menor al observado en la parte aérea incubada en agua durante los primeros 20 min. A tiempos posteriores, los niveles de IP₃ permanecieron similares o incluso fueron menores a los del control. El análogo inactivo β-ANA produjo también un incremento muy ligero en los niveles de IP₃ en los primeros 15 min.; sin embargo, fue el único que a tiempos posteriores incrementó los niveles de este segundo mensajero (Figura 15).

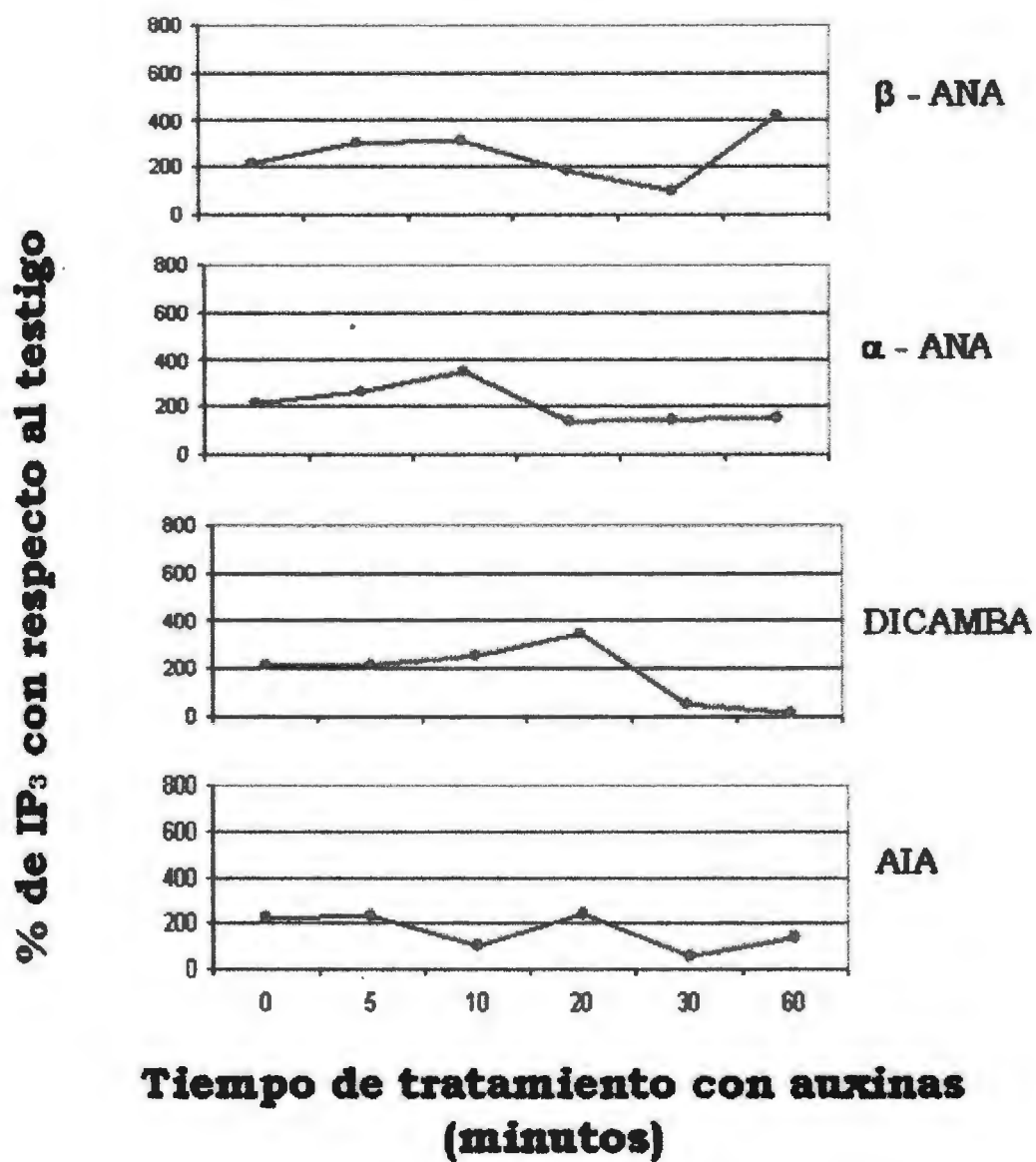


Figura 15. Niveles de IP₃ en la parte aérea de ejes embrionarios recién emergidos tratados por diferentes periodos de tiempo con auxinas.

Para tratar de mejorar la separación de los fosfoinosítidos se implementó una nueva técnica de separación. Esta técnica utiliza otra placa de cromatografía en soporte de aluminio 25TLC (Merk, 0B033695) en lugar de placas de silica gel LK5D (Whatman.), asimismo se utilizó otro eluyente para la separación cloroformo/metanol/acetona/ácido acético/agua (40:14:15:12:7 v/v/v/v/v) en lugar de cloroformo/metanol/hidróxido de amonio/agua (86:76:6:16 v/v/v/v) y esto permitió una mayor separación y resolución de los fosfoinosítidos, pudiendo detectarse PA, LPA/DGPP, PIP, PIP₂ y LPIP. Por otra parte, para detectar algunos fosfoinosítidos presentes en muy bajos niveles se llevó a cabo un experimento en el que se marcaron con [γ -³²P] ATP, las membranas microsomales extraídas de los tejidos tratados o sin tratar con las auxinas. Resultados preliminares mostraron un incremento en la incorporación de marca radiactiva (³²P) en los fosfoinosítidos PIP, PIP₂ y LPIP de los tejidos tratados con la auxina natural AIA y la auxina sintética α -ANA y sólo α -ANA aumenta los niveles de PA (Figura 16).

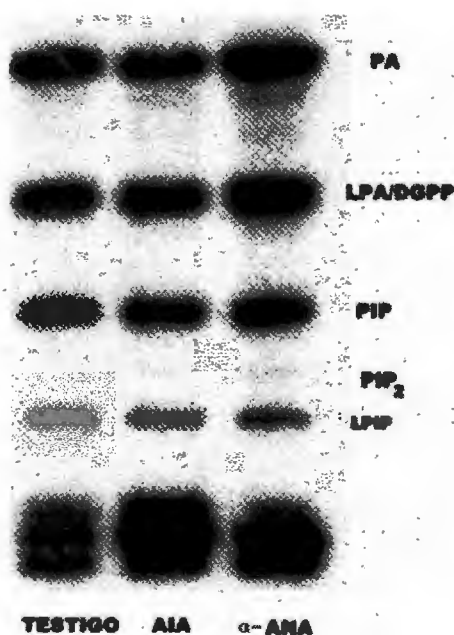


Figura 16. Cromatografía en capa fina de fosfoinosítidos marcados con [³²P]

DISCUSIÓN

En los ejes embrionarios de granos imbibidos apareció el PI, lo que podría deberse a una menor velocidad de recambio de este fosfoinosítido, ocasionada por la disminución en la actividad de las enzimas que lo metabolizan como la PLA ó la PLC. El hecho de que no se detecte PIP podría deberse a que la cantidad de este fosfoinosítido no sea suficiente para ser detectada mediante la técnica utilizada (Figura 7).

En los ejes embrionarios tratados por una hora con DICAMBA o AIA se observó una disminución en los niveles de PA a las 24 y 48 hr. de imbibición respectivamente, lo cual podría deberse a una reducción en la actividad de la PLD, y/o a una disminución de la vía acoplada de PLC y DAGK, o a una mayor remoción del ácido fosfatídico por su fosfatasa (Figura 8 y Figura 9). Estos resultados podían indicar la participación de PA en la vía de transducción de auxinas.

En los siguientes experimentos se decidió disectar el eje embrionario en la parte aérea y en la radícula para analizar por separado su respuesta a las auxinas. Lo anterior debido a que los tejidos de los ejes embrionarios de granos de maíz son heterogéneos, que las auxinas pueden tener respuestas antagónicas; por ejemplo, inducen la elongación en los coleóptilos, mientras que inhiben el crecimiento de las raíces y que la sensibilidad y el tiempo de respuesta a estas auxinas pueden ser variables. Al disectar los tejidos del eje embrionario fue posible detectar PI cuya presencia pudo estar enmascarada por su baja proporción cuando se analizó el eje embrionario completo.

Por otra parte, al analizar la respuesta específica de los tejidos a las auxinas, se decidió incorporar en estos estudios a la auxina sintética α -ANA debido a que está disponible comercialmente un análogo de esta auxina (β -ANA) el cual tiene una estructura química muy similar, no posee actividad auxínica.

En radículas a las 24 hr. de imbibición se observó una disminución de PI, lo que probablemente no sea un efecto específico de las auxinas, porque el análogo inactivo también lo disminuye; este efecto tal vez se deba a la etapa de desarrollo del eje embrionario, a un aumento en la acción de la PLC que produciría inositol fosfato (IP) y DAG y/o a la acción de la PLD que produciría PA e inositol. Sin embargo, no se observó un incremento de PA probablemente por que se recambie a otros fosfoinosítidos (Figura 10).

En la parte aérea de granos imbibidos se observó una disminución en los niveles de PA en presencia de las auxinas α -ANA (24 hr.) y AIA (48 hr.) que podría deberse a una disminución en su producción o a un aumento en su metabolismo hacia otros fosfoinosítidos. Asimismo, estos resultados indican que los cambios observados en PA en el eje embrionario completo provienen de la parte aérea, ya que en la radícula no hay cambios en los niveles de este fosfoinosítido. Como resultado de la disección del eje embrionario se encontró que la presencia de PI proviene de la radícula y no de la parte aérea, como se observa al analizar por separado estas partes. En relación a PIP, éste no se había logrado detectar en los experimentos anteriores, probablemente por sus bajos niveles en el eje embrionario completo, y en este caso su detección podría deberse a que no se diluye con otros tejidos que lo contengan en niveles no detectables. El incremento en los niveles de PIP por acción de las auxinas AIA y α -ANA podría deberse a un aumento en la fosforilación de PI para formar este fosfoinosítido, y/o a una disminución en la actividad de las fosfolipasas que lo hidrolizan, o a una disminución en su fosforilación para transformarlo a PIP₂ (Figura 11).

En todos los estudios anteriores, el tratamiento con auxinas se dio por una hora en granos imbibidos en tiempos definidos (23 o 47 hr.); sin embargo, se observó una heterogeneidad en las muestras analizadas debido a que, en un tiempo determinado, los granos alcanzan etapas de desarrollo distintas. Para evitar esta heterogeneidad se decidió trabajar

con el eje embrionario en una etapa de desarrollo definida, en lugar del eje embrionario imbibido por cierto tiempo. Se escogieron tres etapas de desarrollo:

- a) Sin emerger. Los granos se imbibieron por 30 hr. y se seleccionaron aquellos en los cuales la radícula no había emergido.
- b) Recién emergida. Los granos se imbibieron por 36 hr. y se seleccionaron aquellos que ya habían germinado y la parte aérea se encontraba recién emergida.
- c) 1 cm de longitud. Los granos se imbibieron por 50 hr. y se seleccionaron aquellos que ya habían germinado y en los que la parte aérea emergida media 1cm.

A los cuales se les aplicó un tratamiento por una hora con las auxinas estudiadas.

Como se observó en la Figura 12, en las partes aéreas de granos imbibidos en agua, no hay un efecto de la etapa de desarrollo en los niveles de IP_3 , el cual fue cuantificado en la parte soluble y no en las membranas. No obstante, se observó que la respuesta a las auxinas sí difirió en función de la etapa de desarrollo y de la auxina analizada. La auxina sintética DICAMBA disminuyó los niveles de IP_3 con respecto al testigo y la otra auxina sintética, α -ANA, no produjo cambios significativos en estos niveles, en las etapas de desarrollo sin emerger y recién emergida. Por otra parte, la auxina AIA incrementó los niveles de IP_3 con respecto al testigo en la parte aérea sin emerger y de 1 cm de longitud; sin embargo, este efecto es difícil de explicar, ya que el análogo que no posee actividad auxínica, β -ANA, también indujo efectos similares.

El análisis cinético de los niveles de IP_3 en la parte aérea del eje recién emergido, tratado con auxinas corroboró, que a tiempos cortos (0 – 20 min.) se detectan cambios en los niveles de IP_3 , los cuales no se logran detectar a tiempos más largos (60 min.). Se encontró que a los 10 min. de incubación en agua se produjo un incremento de más de tres veces de los

niveles de IP_3 con respecto a la parte aérea recién disectada, lo que podría considerarse un error en la determinación y debido a que no existieron repeticiones y a que con el análogo inactivo no sucede esto podría considerarse que los niveles de IP_3 no aumentan (Figura 14). La aplicación del tratamiento con auxinas, al parecer, inhibe este incremento (Figura 15). Estos resultados contrastan con los encontrados por Ettlinger y Lehle (1988) quienes reportaron que en células en cultivo de *Catharanthus roseus* la aplicación de la auxina 2,4-D induce un incremento de aproximadamente tres veces en los niveles de IP_3 durante los primeros 3 minutos del tratamiento. En nuestro caso el tiempo más corto probado fue de 5 min. ya que trabajamos con los tejidos de la parte aérea y no con células aisladas y se debe considerar el tiempo de incorporación.

En busca de una mejor separación y una mayor sensibilidad se montó un sistema con ^{32}P , el cual permito la separación de PIP_2 , PIP y PA , además de $LPIP$, PIP y $LPA/DGPP$, fosfoinosítidos que no se detectaban con la técnica anterior. La identificación de liso-fosfolípidos, puede indicar la activación de la PLA_2 en maíz por las auxinas, ya que en la literatura se ha reportado que entre las respuestas rápidas de las células vegetales a auxinas se encuentra la activación de fosfolipasas, específicamente la PLA_2 . En segmentos de hipocótilos de girasol el incremento del crecimiento en respuesta a auxinas estuvo asociado a una rápida activación (entre 15 y 30 min.) de la actividad de la PLA_2 (Chapman, 1998). Esto se podría corroborar mediante un estudio cinético de los fosfoinosítidos a tiempos menores a los 60 min. en presencia de auxinas. Además el aparente aumento en los niveles de PA por acción de la auxina α -ANA, podría ser el resultado de la activación de la PLD y/o a una disminución de la vía acoplada de PLC y $DAGK$. Estos resultados podrían estar indicando un mayor recambio en los fosfoinosítidos en los tejidos tratados con auxinas.

CONCLUSIONES

- La imbibición de los granos de maíz cambia el patrón de fosfoinosítidos con respecto al grano seco.
- La aplicación exógena de auxinas altera el patrón de fosfoinosítidos con respecto al testigo (granos imbibidos en agua) lo cual apoya la idea de la participación de estos fosfoinosítidos en el mecanismo de acción de estas hormonas.
- El patrón de fosfoinosítidos como respuesta a las auxinas depende de los tejidos analizados (eje completo, radícula y parte aérea).
- El patrón de fosfoinosítidos como respuesta a las auxinas también depende de la etapa de desarrollo del tejido analizado (parte aérea sin emerger, recién emergida o de 1cm. de longitud).
- El distinto patrón de fosfoinosítidos inducido en la parte aérea y en la radícula, dos tejidos con distinta respuesta a las auxinas, apoya la idea de que cada tejido tiene un mecanismo de acción particular.

PERSPECTIVAS

La literatura indica que en otros sistemas como células en cultivo, los cambios en los niveles de algunos fosfoinosítidos, como el IP_3 , ocurren muy rápido (en tiempos inferiores a 5 min.), por lo cual sería recomendable determinar los niveles de los diferentes fosfolípidos de inositol, tanto IP_3 como los fosfoinosítidos a tiempos más cortos de tratamiento con las diferentes auxinas estudiadas. Por otra parte, la cromatografía en capa fina técnica permitiría también determinar la actividad de las distintas enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfoinosítidos (lipasas, cinasas, fosfatasas), a través de la medición de sus productos en las condiciones apropiadas. Estos estudios permitirían conocer la(s) enzima(s) del metabolismo de fosfoinosítidos que son reguladas por las auxinas en maíz.

BIBLIOGRAFÍA

Abel, S. y Theologis, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.

Alberts, B., Bray D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the cell.* Alberts, B., Bray D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. (eds.) Garland Publishing, Inc. New York & London.

Beltrán, P.E., Aguilar, R., Ortiz, L.A., Dinkova, T. y Sánchez de Jiménez, E. 2001. Artículo no publicado

Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. y Tsichlis, P.N. 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 965-1014.

Chapman, K. D. 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci.* 3(11): 419-426.

Cheung, S.P. y Cleland, R.E. 1991. Galactose inhibits auxin-induced growth of *Avena* coleoptiles by two mechanisms. *Plant Cell Physiol.* 32(7): 1015-1019.

Cho, M.H. y Boss, W.F. 1995. Transmembrane signaling and phosphoinositides. *Methods in Cell Biology.* 49: 543-553.

Dinkova, T.D., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 2000. Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem. J.* 351: 825-831.

Drøbak , B.K. 1992. The plant phosphoinositide system. *Biochem. J.* 288: 697-712.

Drøbak , B.K. 1993. Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol.* 102: 705-709.

Edelmann, H. y Schopfer, P. 1989. Role of protein and RNA synthesis in the initiation of auxin-mediated growth in coleoptiles of *Zea mays* L. *Planta.* 179: 475-485.

Eliasson,L., Bertell, G. Y Bolander, E. 1989. Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. *Plant Physiol.* 91: 310-314.

Einspahr, K.J. y Thompson, Jr. G.A. 1990. Transmembrane signalling via phosphatidylinositol 4,5 biphosphate hydrolysis in plants. *Plant Physiol.* 93: 361-366.

Ettlinger, C. y Lehle, L. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature.* 331: 176-1786.

Frank,W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F. y Bartels, D. 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell.* 12: 111-123.

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. y Chen, J. 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science.* 294:1942-1945.

Gantt, J.S. y Key, J.L. 1985. Coordinate expression of ribosomal protein mRNA following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 260: 6175-6181.

Garbers, Ch. y Simmons, C. 1994. Approaches to understanding auxin action. *Trends Cell Biol.* 4: 245-250.

García, F.C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. y Sánchez de Jiménez E. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* 358: 95-100.

Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmasov y J. Murfett. 1998. How does auxin turn on genes?. *Plant Physiol.* 118: 341-347.

Hicks, G.R., Rice, M.S. y Lomax, T.L. 1993. Characterization of auxin-binding proteins from zucchini plasma membrane. *Planta.* 189: 83-90.

Hla, T., Lee, M.J., Ancellin, N., Paik, J.H. y Kluk, M.J. 2001. Lysophospholipids-receptor revelations. *Science.* 294: 1875-1878.

Hobbie, L., Timpfe, C. y Estelle, M. 1994. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol. Biol.* 26: 1499-1519.

Irvinie, R.F. 1990. Inositol phosphates as intracellular second messengers. In: Naborski, S.R. (ed) *Transmembrane signaling, intracellular messengers and implications for drug development.* Jonh Wiley & Sons Ltd., pp169-181.

Jefferies, H.B.J., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, Ch., Pearson, R.B., Thomas, G. 1997. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70^{S6k}. EMBO J. 16: 3693-3704.

Karp, G. 1996. Biología celular y molecular. McGraw-Hill interamericana. México.

Macdonald, H. 1997. Auxin perception and signal transduction. Physiol. Plant. 100: 423-430.

Meijer, H.J., Berrie, C.P., Iurisci, C., Divecha, N., Musgrave, A. y Munnik, T. 2001. Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. Biochem. J. 360: 491-498.

Meuwly, P. y Pilet, P.E. 1991. Simultaneous gas chromatography - mass spectrometry quantification of endogenous [¹²C]- and applied [¹³C] Indole-3yl- acetic acid levels in growing maize roots. Plant Physiol. 95: 179-183.

Munnik, T., Arisz, S.A., de Vrije, T. y Musgrave, A. 1995. G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. Plant Cell. 7: 2197-2210.

Munnik, T, Van Himbergen, J. A. J., Ter Riet, B., Braun, F. J., Irvine, R. F., Vanden Ende, H. and Musgrave, A. 1998a. Detailed analysis of the turnover of phosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non - permeabilizing concentrations of mastoporan. Planta 207: 133 - 145

Munnik, T, Irvine, R.F. y Musgrave A. 1998b. Phospholipid signalling in plants. Bioch. Biophys. Acta 1389: 222-272.

Napier, P.M. y Venis, M.A. 1991. From auxin-binding protein to plant hormone receptor?. *Trends Biochem. Sci.* 16: 72-75.

Park, W.J., Schäfer, A., Prinsen, E., van Onckelen, H., Kang, B.G. y Hertel, R. 2001. Auxin-induced elongation of short maize coleoptile segments is supported by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Planta*. 213: 92-100.

Pérez, F.L., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 1987. Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiol. Plant.* 69: 517-522.

Pérez, F.L., Aguilar, R., Pérez, M.A. y Sánchez de Jiménez, E. 1990. Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissue. *Plant Physiol.* 94: 1270-1275.

Rameh, L.E. y Cantley, 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274(113): 8347-8350.

Sánchez de Jiménez, E., Albores, M. y Loyola, V.M. 1981. Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. appl. Biol.* 98: 347-353.

Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., y Dinkova, T. 1997. S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie*. 79: 187-194.

Sato, T., Overduin, M. y Emr, S.D. 2001. Location, location, location: membrana targeting direct by PX domains. *Science* 294: 1881-1885.

Scherer, G.F.E. y Arnold, B. 1997. Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin - dependent growth. Implications for auxin - induced signal transduction. *Planta* 202: 462 - 469

Sitbon, F. y Perrot, C. R. 1997. Expresión of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant.* 100: 443-455.

Stevenson, J.M., Perera, I.Y., Heilmann, I., Persson, S. y Boss, W.F. 2000. Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci.* 5(6): 252-258.

Van der luit, A.H., Piatti, T., van Doorn, A., Musgrave, A., Felix, G., Boller, T. y Munnik, T. 2000. Elicitation of suspensión-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123: 1507-1515.

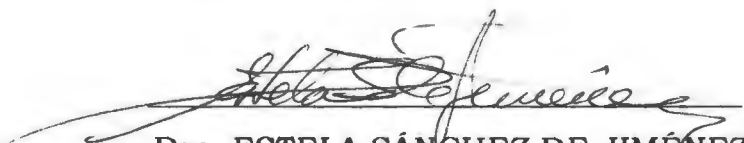
Walker, L. y Estelle, M. 1998. Molecular mechanisms of auxin. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(5): 434-439.

Wang, X., L. Xu y L. Zheng. 1994. Cloning and expresión of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* 269(32): 20312-20317.

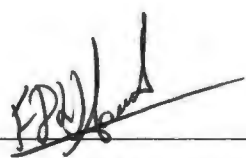
Wang, X. 1999. The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiol.* 120: 645-651.

Yang, W., Burkhart, W., Cavallius, J., Merrick, W.C. y Boss, W.F. 1993. Purification and chacterization of phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *J. Biol. Chem.* 268(1): 392-398.

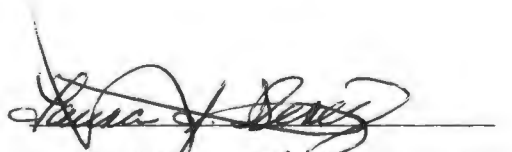
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 2 de Abril del 2002.



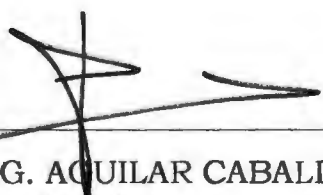
Dra. ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ
Presidente



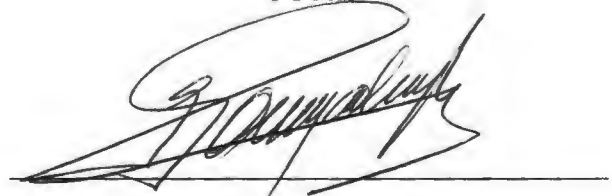
M. en C. FERNANDO DÍAZ DE LEÓN SÁNCHEZ
Secretario



Dra. LAURA J. PÉREZ FLORES
Vocal



M. en C. RAÚL G. AQUILAR CABALLERO
Vocal



Dr. Humberto González Márquez
Vocal