



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE LOS COMPUESTOS FITOTOXICOS DEL POLEN  
DE Zea Mays chalquiñocónico Hdez. (Fam. Gramineae)  
SOBRE LA RESPIRACION Y LA DIVISION CELULAR DE  
Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum y Nakai (Fam.  
Cucurbitaceae)

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

María del Rocío Cruz Ortega



## **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 está 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.

## INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	1
I. INTRODUCCION	
1. Concepto de Alelopatía	2
2. Respiración Celular	4
2.a. Características de las Mitocondrias Vegetales	10
2.b. Control Respiratorio y Relación ADP/O	11
3. División Celular o Mitosis	12
4. Antecedentes de los Efectos de Compuestos Alelopáticos Sobre la Respiración y División Celular	14
4.a. Efectos Sobre la Respiración Celular	14
4.b. Efectos Sobre la División Celular	16
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVO	17
III. MATERIALES Y METODOS	19
1.a. Bioensayo con Polen	19
1.b. Bioensayo con Extracto Etanólico	19
2.a. Aislamiento de Mitocondrias Vegetales	20
2.b. Pruebas de Consumo de Oxígeno	22
2.c. Partículas Submitocondriales	22
3. División Celular	23
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSION	52
VI. CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58

## ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
BSA	Seroalbúmina de bovino
DNP	2,4 dinitro fenol
EDTA	Acido etilen diamino-tetra-acético
NAD <sup>+</sup> , NADH	Nicotinamida-adenin dinucleotido (nucleótido difosfopiridínico) y su forma reducida
TMPD	Ascorbato-tetrametil-para-fenil-diamina
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de conocer los efectos del polen de Zea mays chalquifocónico Hdez. y de un extracto etanólico del mismo sobre: 1) el crecimiento radicular, 2) la respiración celular y 3) la mitosis de Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum y Nakai (Familia Cucurbitaceae). (Sandía).

En la parte experimental se realizaron diversos bioensayos de germinación; registros de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de hipocótilos crecidos en la oscuridad y una evaluación del Índice Mitótico en preparaciones de células meristemáticas.

Los resultados mostraron que el polen de maíz y el extracto etanólico inhiben el crecimiento radicular de las plántulas de sandía. El extracto etanólico inhibió el consumo de oxígeno en mitocondrias en estado 3 con malato y succinato como sustratos, actuando como un inhibidor de la cadena de transporte de electrones; se encontró que el sitio probable de inhibición es anterior al citocromo "c". La actividad mitótica disminuyó en las células meristemáticas tratadas con polen de maíz y con el extracto etanólico.

Se discute la importancia del estudio de los mecanismos de acción en el campo de la Alelopatía.

## I. INTRODUCCION

### 1. CONCEPTO DE ALELOPATIA

Las plantas son fuente de una gran diversidad de compuestos químicos, inorgánicos y orgánicos; de estos últimos, se sabe que muchos no intervienen directamente en el metabolismo básico de la célula, como lo hacen las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. Estos compuestos pertenecen a los llamados metabolitos secundarios (Whittaker y Feeny, 1971), cuya función es aún objeto de controversia; sin embargo, han sido considerados como productos especiales del metabolismo primario, relacionados en ocasiones con funciones de protección de la planta (Swain, 1977). Muchos de estos compuestos son el origen de las interacciones químicas entre las plantas, que se dan a través de la liberación de estos compuestos al ambiente.

Los compuestos liberados pueden afectar de alguna manera a otros organismos que están expuestos directa e indirectamente a su influencia. Estas interacciones químicas son objeto de estudio de la Alelopatía, la cual puede ser definida como cualquier efecto, benéfico o perjudicial de una planta sobre otra a través de la producción de compuestos químicos liberados al medio (Rice, 1979; Rice, 1984). Grodzinsky (1965) define a la alelopatía como una función del ciclo de sustancias activas dentro de un ecosistema, el cual es iniciado con la producción y liberación al medio de los compuestos, o sus precursores, por una planta "donadora" que interactúa con una planta "receptora".

Los compuestos químicos involucrados en la alelopatía, se conocen como aleloquímicos, alelopáticos o compuestos fitotóxicos (Whittaker y Feeny, 1971). Pertenecen a una gran variedad de grupos químicos, como

son los alcaloides, los terpenos, las lactonas, los amino-ácidos y polipéptidos, los glucósidos cianogénicos y los fenoles, entre otros. En los fenoles se encuentran los compuestos más conocidos como inhibidores alelopáticos producidos por plantas superiores. Dentro de ellos, son ejemplos, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido p-cumárico, el ácido vainillínico, la quercetina, la hidroquinona y otros. Estos compuestos se llegan a acumular en el suelo, hasta niveles tóxicos para las plantas (Rice, 1974), o bien, pueden sufrir alteraciones y ser inactivados, neutralizados o cambiados por otros compuestos aún más tóxicos por la acción del metabolismo microbiano.

En la mayoría de las plantas, las hojas y la raíz son la fuente principal de compuestos alelopáticos. Con frecuencia estos compuestos pueden ser nocivos para las mismas plantas que los producen, por lo que éstas poseen diversos mecanismos de autodefensa, por ejemplo: los neutralizan formando glucósidos y los almacenan en las vacuolas, lejos de las zonas donde se efectúan reacciones metabólicas de importancia o bien los liberan al medio para no verse afectadas.

La liberación de los compuestos alelopáticos al medio ambiente puede ocurrir por: 1) volatilización, a través de las hojas, como los terpenos y aceites esenciales; 2) lixiviación de compuestos solubles en agua, de las partes aéreas por la acción de la lluvia, la niebla y el rocío, como los alcaloides, fenoles, ácidos orgánicos; 3) exudación o excreción de compuestos solubles a través de la raíz, y 4) liberación de compuestos del material vegetal muerto (hojarasca) a través de su lixiviación o por la descomposición microbiana del mismo (Tukey, 1969).

Después de que los compuestos alelopáticos han sido liberados al medio exterior por las plantas productoras, deben acumularse en suficiente cantidad o ser constantemente liberados para producir un efecto

sobre plantas "sensibles", el cual generalmente se va a manifestar como: una reducción en su germinación, una inhibición de su desarrollo y/o vigor, un retraso o ausencia en la floración y/o fructificación, una inhibición del crecimiento radicular y/o del tallo, así como alteraciones en la pigmentación. Todas estas manifestaciones van acompañadas necesariamente de alteraciones en el metabolismo celular de cada organismo.

Los mecanismos por medio de los cuales los diferentes compuestos alelopáticos causan esas inhibiciones, no se conocen a fondo. Sin embargo, los pocos trabajos conocidos sobre el tema muestran que los compuestos pueden afectar a un gran número de procesos metabólicos, y que actúan en varios sitios dentro de la célula vegetal (Figura 1) (Demos et al, 1975, Putnam, 1983). Los estudios de los efectos sobre el metabolismo mitocondrial, que incluyen a la respiración y la fosforilación oxidativa, así como sobre la división celular, son de gran importancia para determinar los probables mecanismos de acción, dado que son procesos esenciales para el crecimiento y desarrollo primario de las plantas.

A continuación se describen someramente los procesos de respiración y división celular.

## 2. RESPIRACION CELULAR

Las células vegetales al igual que las células animales, obtienen parte de su energía metabólica (ATP) necesaria a través del proceso de la respiración, que es la oxidación de los nutrientes por el oxígeno molecular. Este proceso se lleva a cabo dentro de los organelos celulares llamados mitocondrias.

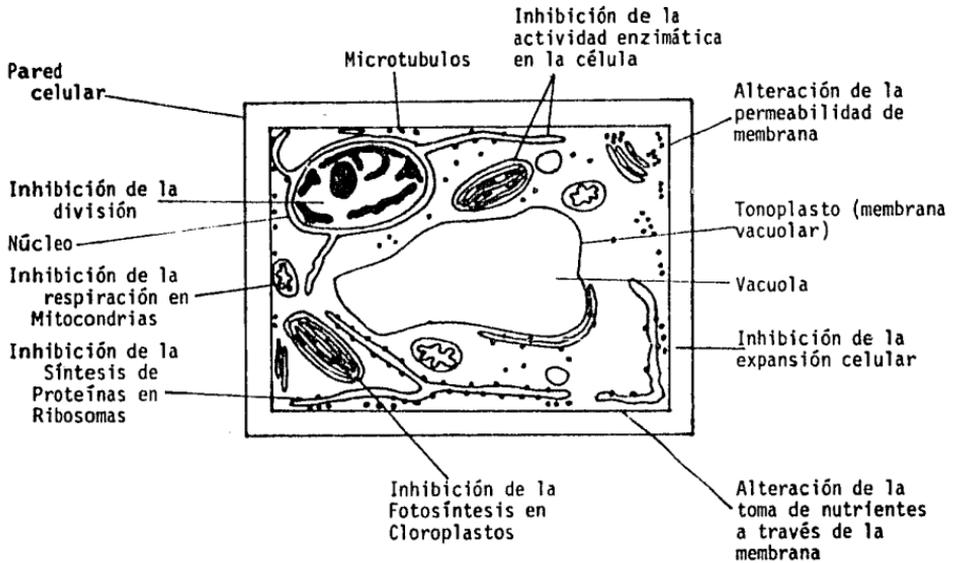


Fig. 1. Los compuestos alelopáticos pueden actuar en varios sitios dentro de una célula vegetal. (tomado de Putnam, 1983).

Las mitocondrias de células vegetales, son similares en cuanto a estructura y función a las mitocondrias de células animales (Storey, 1980). La mayoría de las células vegetales contienen varios cientos de mitocondrias de forma esférica, elipsoidal o redonda. Generalmente el número, tamaño y colocación de las mitocondrias, parece estar relacionado con las demandas de energía de la célula. Las mitocondrias están formadas por: una membrana externa permeable, una membrana interna impermeable que forma pliegues en el interior, llamados crestas; un espacio intermembrana y una matriz (Figura 2). Dentro de estos compartimentos funcionales, se localizan los complejos enzimáticos necesarios para que se lleve a cabo el proceso de respiración, a través del ciclo del ácido tricarboxílico, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Hanson y Day, 1980). Las principales rutas metabólicas se muestran en la Figura 3.

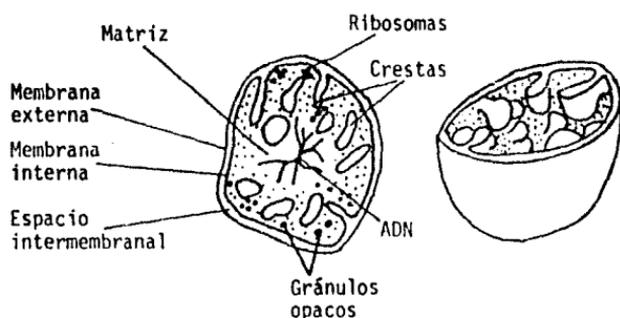


Fig. 2. Ilustración de la organización y estructura de mitocondrias vegetales. (tomada de Hanson y Day, 1980)

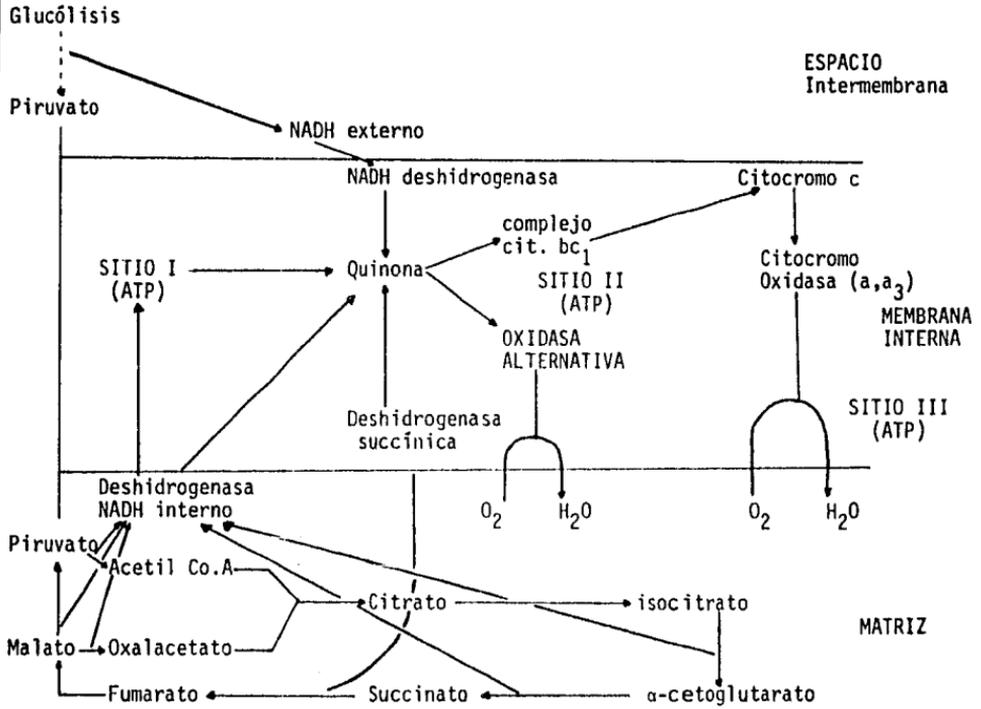


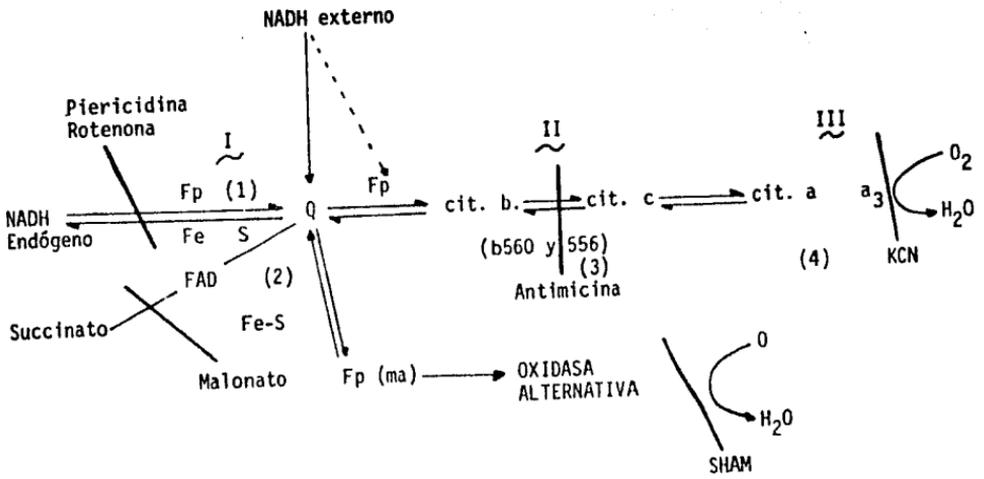
Figura 3. Rutas principales de oxidación de sustratos en mitocondrias de células vegetales. (tomado de Moore y Rich, 1980).

La subsecuente oxidación de los productos del ciclo del ácido tricarboxílico (NADH y succinato), se efectúa a través de las enzimas de oxido-reducción de la cadena de transporte de electrones, la cual es similar en componentes, tipos de reacción y mecanismo de fosforilación oxidativa a la presente en mitocondrias animales, aun cuando su organización es más compleja (Palmer, 1976; Moore y Rich, 1980).

En la Figura 4, se muestra la cadena de transporte de electrones, la cual se localiza en la membrana interna. Está formada por cuatro sistemas enzimáticos que acarrean los electrones producidos en el ciclo del ácido tricarboxílico. La NADH deshidrogenasa (1) y la deshidrogenasa succínica (2), formadas de flavoproteínas y proteínas ferro-sulfuradas, transportan los electrones a un catalizador, la coenzima Q u Ubiquinona ( $UQ_{10}$ ), la cual transfiere los electrones al complejo de citocromos "b-c<sub>1</sub>" (3), que contienen una proteína ferro-sulfurada, dos moléculas de citocromo "b" (b 556 y b 560)\* y una molécula de citocromo "c" (c 552)\*; éste último reduce al complejo citocromo oxidasa (4), formado por citocromo "a" y átomos de cobre y citocromo "a<sub>3</sub>", los cuales ceden los electrones al oxígeno, último aceptor, para formar agua (Palmer, 1976; Hanson y Day, 1980; Day et al, 1980).

El transporte de electrones está asociado a tres sitios de producción de energía (Figura 4). en los cuales la energía generada durante el transporte de electrones es utilizada para la fosforilación del ATP a partir de ADP y Pi (fósforo inorgánico). La hipótesis más aceptada para explicar el mecanismo de fosforilación oxidativa es la propuesta por Mitchell (1961, 1966, en Storey, 1980), en la cual la conservación de la energía se logra por un gradiente de iones  $H_2$  a

\* bandas de absorción en un espectrofotómetro.



Inhibidores:	Complejo (1)	Complejo (2)	Complejo (3)	Complejo (4)
- Piericidina		- Malonato	- Antimicina A	- CN <sup>-</sup>
- Amital				- N <sub>3</sub> <sup>-</sup>
- Rotenona				- CO

Figura 4. Vía respiratoria probable en mitocondrias de células vegetales. Fp = flavoproteína; Fe-S = protefna ferro sulfurosa; Q = ubiquinona; b, c y a = citocromos. Con números romanos se señalan los sitios de producción de energía. Con números cardinales los complejos enzimáticos. SHAM = ácido salixilhidroxámico. (tomado de Day et al, 1980).

través de la membrana interna, dando lugar a una diferencia de potencial electroquímico, llamado fuerza protomotriz. Elthon y Stewart (1983) presentan un modelo con base en esta hipótesis en mitocondrias de células vegetales.

La cadena de transporte de electrones puede ser inhibida por la acción de compuestos químicos que bloquean específicamente a los complejos enzimáticos (Figura 4). También existen compuestos que inhiben la fosforilación sin afectar la cadena de transporte de electrones, como son los agentes desacoplantes como el 2,4 dinitro-fenol (DNP), que permiten el paso de los electrones pero no la síntesis de ATP. Otros inhibidores, como lo es la Oligomicina, afectan tanto a la cadena de electrones como a la fosforilación.

## 2.a. Características de las mitocondrias vegetales.

Las mitocondrias vegetales presentan ciertas características que las diferencian de las mitocondrias animales. Además de la vía de oxidación citocrómica al Oxígeno molecular, presentan una vía de oxidación alternativa, caracterizada por una insensibilidad hacia inhibidores como el cianuro, la azida, el monóxido de carbono y la antimicina, todos ellos muy potentes en mitocondrias animales (Moore y Rich, 1980); sin embargo son sensibles a los ácidos hidroxámicos como el SHAM (ácido salicilhidroxámico). Esta vía no es fosforilante, la energía de oxidación es liberada en forma de calor y su papel metabólico dentro de la célula vegetal es todavía muy discutido. (Palmer, 1976).

Las mitocondrias vegetales son capaces de oxidar NADH externo a través de dos complejos de deshidrogenasas, uno asociado a la membrana externa y otro a la cara externa de la membrana interna (Douce et al, 1973). A diferencia de la deshidrogenasa interna, este complejo es insensible a los inhibidores como la rotenona, la piericidina A, pero es sensible a la antimicina y al cianuro, lo que sugiere que esta deshidrogenasa dona los electrones a nivel de la Ubiquinona. La oxidación de la NADH deshidrogenasa externa está asociada a dos sitios de producción de ATP (Moore, 1978; Moore y Rich, 1980).

Las mitocondrias vegetales también pueden oxidar malato en la ausencia de glutamato o de una fuente de acetyl coenzima A, y pueden utilizar glicina como sustrato respiratorio. (Moore y Rich, 1980; Hanson y Day, 1980).

## 2.b. Control respiratorio y relación ADP/O.

El consumo de oxígeno de suspensiones mitocondriales se registra con un electrodo de oxígeno o de Clark. Con estas mediciones se puede definir un control respiratorio (C.R.), el cual es la proporción entre el consumo rápido de oxígeno observado en la fosforilación de una alicuota de ADP (Adenosin difosfato), conocido como estado 3 del consumo de oxígeno, y la velocidad observada después de la fosforilación completa del ADP a ATP, conocido como estado 4 o "lento" del consumo de oxígeno. El control respiratorio generalmente se expresa como: C.R. = velocidad del estado 3 / velocidad del estado 4, el cual es un dato útil para caracterizar el estado de acoplamiento de la oxidación del sustrato y la conservación de energía. (Storey, 1980).

La estequiometría de producción de ATP a partir de ADP, es definida como las moles de ADP fosforilado por átomo-gramo de oxígeno consumido, lo que usualmente se denomina relación ADP/O, la cual depende del sustrato de oxidación. Con malato y piruvato, la relación es de tres ATP, mientras que para el succinato y el NADH externo es de dos, ya que sólo interactúan con dos sitios de producción de energía (Storey, 1980).

### 3. DIVISION CELULAR O MITOSIS

El crecimiento y el desarrollo de los organismos dependen de la multiplicación o división de las células. La mitosis es el proceso de división celular, mediante el cual una célula se divide en dos células hijas.

En el ciclo celular, que comprende un período de interfase (Síntesis, G1 y G2) y un período de división, el material celular se distribuye entre las células hijas. Durante la interfase en el período sintético (S), hay una intensa actividad biosintética, el material genético (ADN) es duplicado, se forman organelos citoplásmicos y material que formará el huso mitótico, para lo cual hay una síntesis de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

La mitosis solo representa una pequeña fracción del ciclo vital de una célula; la mayor parte de su vida permanece en interfase. La división celular comprende varias fases conocidas como: profase, metafase, anafase y telofase, que caracterizan la separación del material cromosómico en las dos células hijas. Al final de la telofase se

produce la citocinesis o separación del citoplasma con la formación de una placa celular, característica en células vegetales. (Fig. 5)

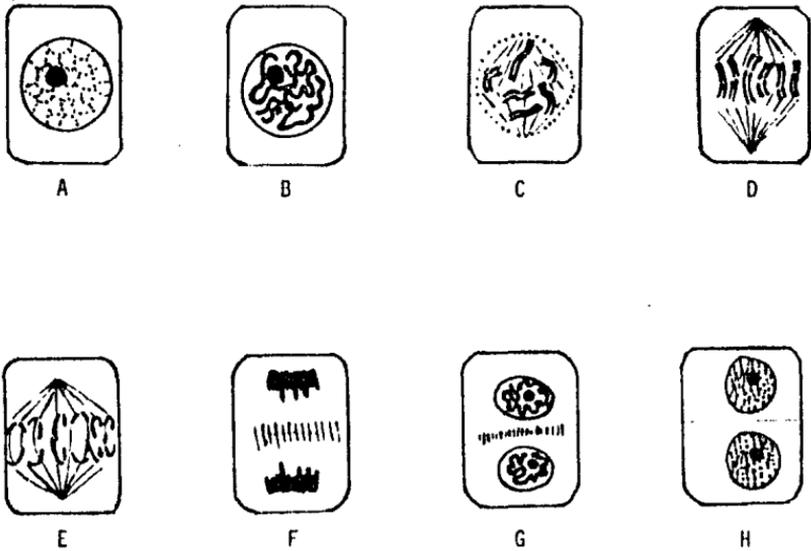


Fig. 5. Serie de diagramas que muestran la división celular o Mitosis en una célula vegetal con seis cromosomas. A: interfase; B: profase temprana; C: profase tardía; D: metafase; E: anafase; F: anafase tardía pasando a telofase; G: telofase tardía; H: interfase. (tomado de Cronquist, 1975)

#### 4. ANTECEDENTES DE LOS EFECTOS DE COMPUESTOS ALELOPATICOS SOBRE LA RESPIRACION Y DIVISION CELULAR.

##### 4.a. Efectos sobre la respiración celular.

Los compuestos alelopáticos son capaces de alterar el metabolismo energético de las células vegetales. Estos pueden estimular o inhibir la respiración, donde ocasionan un desequilibrio en el proceso de fosforilación y por lo tanto una disminución en la producción de moléculas de alta energía (ATP) necesaria para la realización de otras funciones metabólicas (Horsley, 1977; Rice, 1974), como lo muestran los siguientes trabajos:

Patrick y Koch (1958), encontraron que las sustancias tóxicas presentes en un extracto acuoso de residuos de maíz, sorgo, arroz y tabaco, inhiben el crecimiento y el consumo de oxígeno de plántulas de tabaco.

Los monoterpenos volátiles, el cineol y el alcanfor, producidos por Salvia leucophylla, disminuyen la captación de oxígeno en suspensiones mitocondriales de Avena fatua y Cucumis sativus (pepino) (Muller et al, 1968; Muller et al, 1969). Los autores sugirieron que la inhibición afecta el ciclo del ácido tricarbóxico y la permeabilidad de la membrana.

Los flavonoides como la naringenina, el kaempferol, la quercetina, el toxifolin, entre otros inhibidores alelopáticos, fueron probados sobre la producción de ATP en mitocondrias aisladas de hipocótilos de Cucumis sativus. Se encontró que el grado de inhibición estaba relacionado con la estructura química de los flavonoides (Stenlid, 1970).

Lang y Ranker (1974), encontraron que las concentraciones bajas de quercetina y otras flavonas relacionadas, inhiben la actividad de la ATP-asa mitocondrial sin interferir con la fosforilación oxidativa en partículas submitocondriales.

Koeppe (1972), al estudiar los efectos de la juglona (5-hidroxi-naftoquinona)\*, sobre mitocondrias aisladas de Zea mays, encontró un efecto desacoplante, una estimulación de la velocidad de consumo de oxígeno y una disminución en la producción de ATP. Concluyó que este efecto se relaciona con la inhibición observada en los tejidos y organismos tratados con la juglona.

Varios compuestos fenólicos que incluyen ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, aldehidos y cumarinas, que son inhibidores alelopáticos aislados de varias plantas, fueron probados por Van Sumere y colaboradores (1972) sobre mitocondrias aisladas de células de levadura, encontraron que producen un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa.

McCahon y colaboradores (1973) realizaron estudios para determinar la actividad fisiológica de los compuestos: esculina y lactonas sesquiterpénicas de Artemisa tridentata. Encontraron que inhiben el crecimiento y la respiración de plántulas de Cucumis sativus.

El kaempferol (3,5,7 tetrahidroxiflavona), actúa sobre el proceso de fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas de maíz, aunque su efecto no es como el de un desacoplante conocido, el 2,4 dinitrofenol (DNP) (Koeppe y Miller, 1974).

Diez compuestos fenólicos, como el ácido tánico, el ácido vainillínico, el ácido p-cumárico, el ácido p-hidroxibenzoico, entre otros, se probaron sobre el crecimiento, la respiración, la fosforilación oxidativa y el transporte de iones en mitocondrias aisladas de hipocótilos de Phaseolus aureus (frijol) (Demos et al, 1975). Se encontró que todos los compuestos que inhibieron el metabolismo energético también inhibieron el crecimiento.

\* juglona = compuesto alelopático, aislado de Juglans nigra por Marsley, 1925 (Rice, 1974).

Se han realizado estudios con herbicidas para determinar su posible mecanismo de toxicidad. Gauvrit (1978) probó herbicidas urea-sustituídos (cloroxuron, neburon y seduron) sobre mitocondrias aisladas de Solanum tuberosum. Encontró que el cloroxuron inhibió la cadena de transporte de electrones y los otros dos mostraron un efecto desacoplante.

El  $\beta$ -pineno, un monoterpeno presente en la oleoresina del pino, fue probado por Douce y colaboradores (1978), sobre las propiedades oxidativas de mitocondrias de Phaseolus aureus. A concentraciones bajas, el  $\beta$ -pineno ejerció una acción desacoplante, mientras que en concentraciones altas inhibió por completo la cadena de electrones. El mismo compuesto se probó sobre el metabolismo de células de levadura (Peña et al, 1982, comunicación personal) y sobre mitocondrias de hígado de rata (Uribe et al, 1984). En ambos trabajos se encontraron los mismos efectos reportados por Douce y colaboradores (1978), explicando además, que estos efectos se deben a la unión del  $\beta$ -pineno con la membrana mitocondrial.

#### 4.b. Efectos sobre la división celular.

Un criterio para determinar la efectividad relativa de los compuestos alelopáticos es el incremento en tamaño y peso del organismo de prueba, que resulta del proceso de división celular (Rice, 1974). Varios autores han reportado que ciertos compuestos alelopáticos inhiben el proceso de división celular y lo consideran como un mecanismo de acción importante.

Corman (1946) probó soluciones acuosas saturadas de cumarina y ácido parascórbico en células meristemáticas de raíz de cebolla y azucena. Encontró que retrasan la mitosis y observó una acumulación de metafases y células binucleadas. Corman compara este efecto con el obtenido con la colchicina.

Avers y Goodwin (1956) estudiaron los efectos de la cumarina y la escopoletina sobre el crecimiento radicular de Phleum pratense; ambos redujeron la división celular, aunque la escopoletina fue la más potente.

Los extractos acuosos de la corteza de Juglans nigras, retardan y previenen la división en células meristemáticas de Pisum sativum y Vicia faba (Jensen y Welbourne, 1962).

Muller y colaboradores (1965 y Muller et al, 1967) encontraron que los monoterpenos como el cineol y el alcanfor, inhiben la mitosis y la elongación de las células radiculares de Cucumis sativus, en las cuales se observó una apariencia irregular de las células y del núcleo.

Friedman y Waller (1983), encontraron células binucleadas en raíces de plántulas de café, expuestas a diversas concentraciones de cafeína. Atribuyen este hecho a una inhibición del tabique de separación de las células hijas.

## II. ANTECEDENTES Y OBJETIVO

Jiménez y colaboradores (1981 y 1983) demostraron que el polen de Zea mays contiene compuestos alelopáticos o fitotóxicos, capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de otras plantas. Los mismos autores (1981) mencionan que la sandía (Citrullus lanatus) se ve

afectada en su fructificación cuando cae sobre ella el polen del maíz (Zea mays).

Hernández (comunicación personal) atribuye la actividad alelopática del polen de maíz a la presencia de compuestos fenólicos como son el ácido p-hidrobenczoico, el ácido p-cumárico y la hidroquinona, así como a la quercetina identificados en un extracto etanólico de polen.

Con base en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de los compuestos alelopáticos o fitotóxicos presentes en el polén de maíz, sobre los procesos fisiológicos de la respiración y división celular de Citrullus lanatus. Para lo cual se realizaron:

- 1.- Bioensayos o pruebas de toxicidad del polen de maíz y de un extracto etanólico del mismo sobre el crecimiento radicular de Citrullus lanatus.
- 2.- Registros de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de hipocótilos de sandía crecidos en la oscuridad, en presencia y ausencia de extracto etanólico, con sustratos diferentes como malato y succinato, con el fin de localizar el posible sitio de acción en la cadena de transporte de electrones.
- 3.- Determinación del Índice Mitótico, mediante la observación de preparaciones de meristemas radiculares de plántulas de Citrullus lanatus crecidas en presencia y ausencia de extracto etanólico.

### III. MATERIALES Y METODOS

Para detectar el potencial alelopático del polen de Zea mays, el cual fue colectado de las flores masculinas maduras de Zea mays chalquiñocónico Hdez. en Mixquic, D.F., México, y un extracto etanólico (ExEtOH) del mismo sobre el crecimiento radicular de Citrullus lanatus, se realizaron bioensayos de la siguiente manera:

#### III.1.a. Polen.

En cada caja de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro como sustrato, se colocaron 10 semillas de Citrullus lanatus, se espolvorearon por separado tres diferentes concentraciones de polen de maíz (50, 100 y 150 mg), se les agregó 5 ml de agua destilada. Al testigo únicamente se le agregaron los 5 ml de agua destilada. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento. Las cajas se colocaron en una estufa a 27°C y en la oscuridad. Después de un período de siete días se midió la longitud radicular de las semillas de cada tratamiento, y con los datos se realizó un análisis estadístico de bloques completos al azar.

#### III.1.b. Extracto etanólico.

El extracto etanólico se obtuvo sonicando muestras de polen de maíz con alcohol etílico (Baker Analyzed) durante diez minutos. Una vez filtrado, se evaporó a sequedad en un rotavapor R(Buchi), la caracterización preliminar de este extracto, realizada por Hernández (comunicación personal) mostró ser una mezcla de compuestos fenólicos.

El bioensayo se realizó con cinco concentraciones del extracto etanólico (25, 50, 75, 100 y 125 mg), en suspensión homogénea con agua destilada.

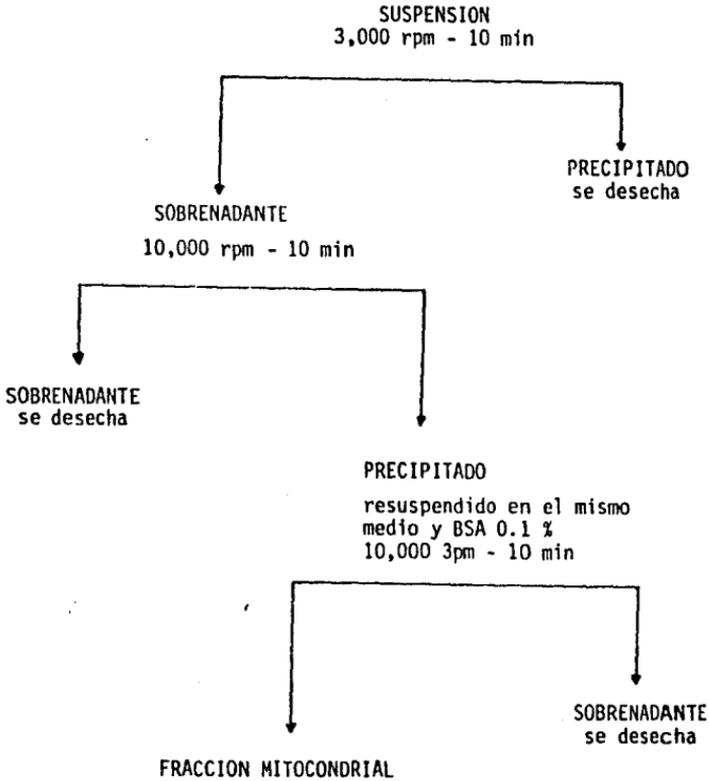
Cada concentración fue adicionada a las cajas con 5 ml de agua destilada con papel filtro como sustrato y once semillas de sandía. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Al testigo se le adicionó únicamente agua destilada. Las cajas se colocaron en una estufa a 27°C y en la oscuridad. Después de un período de siete días se midió la longitud radicular y del tallo de cada semilla y con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico de bloques completos al azar.

### III.2 Aislamiento de mitocondrias de vegetales.

III.2.a. Los efectos de la respiración celular se detectaron sobre mitocondrias aisladas de hipocótilos de semillas de sandía (Citrullus lanatus) germinadas en la oscuridad.

Las semillas de sandía se sembraron en recipientes que contenían vermiculita húmeda, como sustrato. Se colocaron en una estufa a una temperatura de 27°C y una humedad relativa de 50%, en la oscuridad.

Las mitocondrias fueron aisladas de hipocótilos de 10 días de edad, éstos se cortaron en trozos de 1 a 2 cm y se molieron con un medio de sacarosa 0.25 M; EDTA 1 mM, pH 7.4, en un POLYTRON (Brinkman Instruments). El molido se filtró a través de gasa y se ajustó el pH a 7.3 con tris, con la ayuda de un potenciómetro (pH Beckman Modelo 3500 digital); todo esto se realizó en frío a 4°C. Una vez ajustado el pH, el filtrado se sometió a centrifugación diferencial en una centrífuga Sorvall R. C.2-B con cabezal SS-34 a 4°C para aislar las mitocondrias de acuerdo al siguiente esquema:



Las mitocondrias así obtenidas se resuspendieron en aproximadamente 0.5 ml de medio y se homogenizaron en un Potter de vidrio con un vástago de teflón. La cuantificación de proteína se realizó por el Método de Lowry et al (1951) modificado, con un estándar de albúmina (BSA), se obtuvo la concentración de proteína en mg por ml.

III.2.b. Las pruebas de consumo de oxígeno se realizaron en un oxímetro o Electrodo de Clark (YSI Modelo 53 Oxygen Monitor) cubierto por una membrana de teflón, insertado en una cámara de volumen variable con baño a temperatura constante de 30°C. Este electrodo registra el oxígeno disuelto que se encuentra presente en el líquido contenido en la cámara y está conectado a un graficador de escala ajustable. Los datos obtenidos se reportan en nanoátomos de oxígeno consumidos por miligramos de proteína por minuto, o bien como porcentaje de un control (nAO/min/mg).

Con este aparato se midió el consumo de oxígeno de las mitocondrias en un medio de respiración de KCl 10 mM,  $H_3PO_4^-$  Tris 10 mM pH 7.3; BSA 0.1% y como sustratos Glutamato-Malato 10 mM y/o Succinato 10 mM, con un volumen final de 3 ml. En cada trazo se utilizaron 2 mg de mitocondria. Se midieron los estados 3 ó estado activo, dependiente de ADP, y el 4 ó estado de reposo sin ADP.

### III.2.c. Partículas submitocondriales (SMP).

La obtención de partículas submitocondriales se realizó de la siguiente manera:

Las muestras de mitocondrias congeladas, se diluyeron en un medio de sacarosa 0.25 mM, EDTA 1 mM, pH 7.3, y se ajustó el pH a 8.6 con Tris. Se sometieron a sonicación durante un minuto para romper las mitocondrias. Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que resultó se centrifugó a 40,000 rpm durante una hora en una centrifuga preparativa. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el mismo medio. Se cuantificó proteína con el Método de Lowry modificado. Se midió su velocidad de respiración en el Oxímetro o Electrodo de

Clark con NADH como sustrato.

### III.3. División Celular.

Para esta técnica, se utilizaron los meristemas de la raíz de sandía (Citrullus lanatus).

De los bioensayos realizados para probar los efectos del polen de maíz y del extracto etanólico sobre el crecimiento radicular de las semillas de sandía, se tomaron dos semillas por caja de cada concentración y tratamiento, cuando las semillas del testigo alcanzaron una longitud de 1.5 cm que es la longitud ideal obtenida en experimentos anteriores. El experimento se llevó a cabo en la oscuridad para evitar la acción del ritmo circadiano. Las preparaciones se hicieron de la siguiente manera:

Se cortaron 2 mm del extremo distal de la raíz principal, donde se localiza el meristemo y se colocaron los cortes en un portaobjetos excavado para hidrolizarlos con HCl 5N (Sigma) durante 15 minutos.

Se retiró el exceso de HCl y se adicionaron unas gotas del colorante de acetorcefina, el que se dejó actuar durante 40 minutos.

Los cortes se transfirieron a portaobjetos planos con unas gotas de ácido acético al 45% (Baker Analyzed), se colocó un cubreobjetos y se realizó la compresión con la goma de un lápiz, para romper el tejido meristemático y obtener una sola capa de células.

Las preparaciones se hicieron permanentes utilizando la técnica de Conger y Fairchild (1953), es decir, los portaobjetos se colocan sobre hielo seco hasta que se escarchan, se separa el cubreobjetos con un bisturí y las células se deshidratan con dos cambios rápidos de Butanol

absoluto (Baker Analyzed) y se montan con Bálsamo de Canadá (Sigma).

Se evaluó el Índice Mitótico de cada tratamiento sobre campos al azar, al cuantificar un total de 1000 células. El Índice Mitótico se obtuvo dividiendo el número total de células en mitosis, entre el número total de células analizadas. Con los datos se realizó la prueba estadística de diferencia de proporciones.

#### IV. RESULTADOS

##### IV.1. Bioensayos.

IV.1.a. En el experimento con el polen de Zea mays espolvoreado sobre las semillas tratadas de Citrullus lanatus, éstas mostraron una inhibición del crecimiento radicular, siendo ésta mayor cuando la concentración del polen se aumentó. Estos resultados se observan en la Tabla 1 y en las Figuras 6 y 7.

Como se muestra en la tabla del análisis de varianza, la diferencia entre los tratamientos del polen y el testigo es significativa al 1%. Las pruebas de contraste indicaron que los efectos inhibidores de las concentraciones de 100 y 150 mg son similares, ya que no hay una diferencia significativa entre ellas; sin embargo, en las concentraciones de 50 y 150 mg sí hay una diferencia significativa. Podemos observar también que la concentración de 50 mg es suficiente para causar una inhibición mayor del 50%. Además de la inhibición radicular, las raíces tratadas mostraban en la zona de transición, entre la raíz y el tallo, un engrosamiento y una coloración parduzca oscura.

IV.1.b. Los resultados del bioensayo con el extracto etanólico (ExEtOH), sobre el crecimiento radicular y del tallo de Citrullus lanatus, se mues

TABLA 1. Estructura del análisis de bloques completos al azar con los tratamientos de polen espolvoreado de Zea mays sobre Citrullus lanatus.

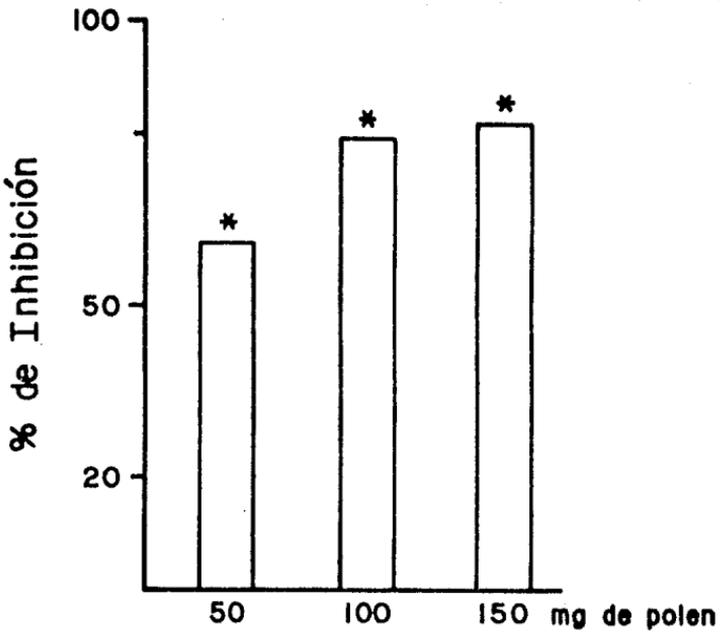
R E P E T I C I O N E S							
TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Total
Testigo H <sub>2</sub> O	3.8	3.2	4.0	3.3	3.9	3.3	21.5
Polen 50 mg	1.3	1.4	1.8	1.2	1.2	1.2	8.2
Polen 100 mg	0.9	0.8	0.8	0.5	0.6	0.7	4.3
Polen 150 mg	0.7	0.9	0.6	0.8	0.4	0.5	3.9
Total	6.7	6.3	7.2	5.8	6.1	5.8	37.9

(los datos se dan en centímetros)

Tabla de Anova:

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	5	0.38	0.076	1.46
Tratamientos	3	34.02	11.34	218.07 *
Error Experimental	15	0.78	0.052	

\* F significativa al 1%



\* F Significativa al 1% con respecto al control

Figura 6.. Efecto de tres concentraciones de polen de Zea mays sobre el crecimiento radicular de Citrullus lanatus.

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS FITOTOXICOS DEL POLEN DE *ZEA MAYS* SOBRE  
EL CRECIMIENTO RADICULAR DE *CITRULUS LANATUS*.

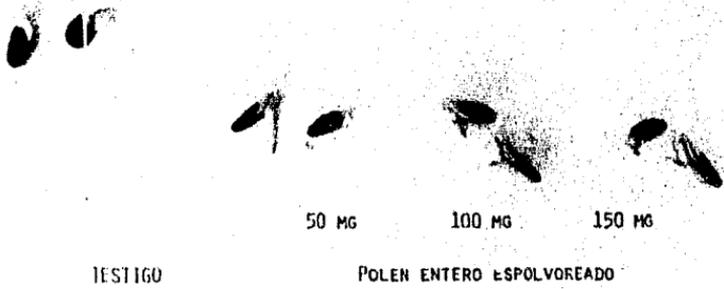


Figura 7. Bioensayo con polen de *Zea mays* espolvoreado.

tran en la Tabla 2 y en las Figuras 8 y 9. El extracto etanólico del polen de Zea mays provocó una inhibición no sólo del crecimiento radicular, sino también del tallo.

Como se puede observar en la Tabla 2, el análisis estadístico mostró que existe una diferencia significativa al 1% entre los tratamientos y el testigo. Las pruebas de contraste indicaron que los efectos de las concentraciones de 25 y 50 mg son similares, así como las de 75 y 100 mg. Desde la concentración de 25 mg se obtiene una inhibición significativa, que se incrementa conforme aumenta la concentración.

La Tabla 3 y las Figuras 8 y 9 muestran los efectos del extracto etanólico sobre el crecimiento del tallo de Citrullus lanatus.

El análisis estadístico mostró que existe una diferencia significativa al 1% entre el testigo y los tratamientos. Las pruebas de contraste indicaron que hay una diferencia al 5% entre las concentraciones de 25 y 50 mg y entre las de 75 y 100 mg. Como se observa en la Figura 8, la inhibición causada por el extracto etanólico fue mayor sobre el tallo que sobre el crecimiento radicular; a partir de la concentración de 75 mg se obtuvo una inhibición mayor del 80%.

Estos resultados muestran que el polen de Zea mays y el extracto etanólico del mismo contienen compuestos fitotóxicos que inhiben el crecimiento de la raíz y el tallo de Citrullus lanatus. Esta inhibición probablemente se debe a la acción que los compuestos fitotóxicos o alelopáticos tienen sobre el metabolismo energético de la célula. Para medir estos efectos, se realizaron pruebas del extracto etanólico sobre mitocondrias aisladas.

Tabla 2. Estructura del análisis de bloques completos al azar para el crecimiento radicular de Citrullus lanatus con extracto etanólico de polen de Zea mays.

R E P E T I C I O N E S						
TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	Total
Testigo H <sub>2</sub> O	4.7	4.6	5.2	5.2	4.9	24.6
ExEtOH 25 mg	3.2	3.4	2.1	3.7	4.7	17.1
ExEtOH 50 mg	2.8	3.2	3.1	3.4	4.4	16.9
ExEtOH 75 mg	2.1	3.6	2.7	2.9	2.1	13.4
ExEtOH 100 mg	2.5	2.8	2.5	2.5	2.8	12.2
ExEtOH 125 mg	2.4	2.5	0.9	1.2	1.3	8.3
Total	17.7	20.1	16.5	19.0	19.2	92.5

(los datos se dan en centímetros)

Tabla de Anova:

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	4	1.3	0.33	1
Tratamientos	5	30.9	6.18	18.7 *
Error Experimental	25	8.3	0.33	

\* F significativa al 1%

Tabla 3. Estructura del análisis de bloques completos al azar para el crecimiento del tallo de Citrullus lanatus con extracto etanólico de polen de Zea mays.

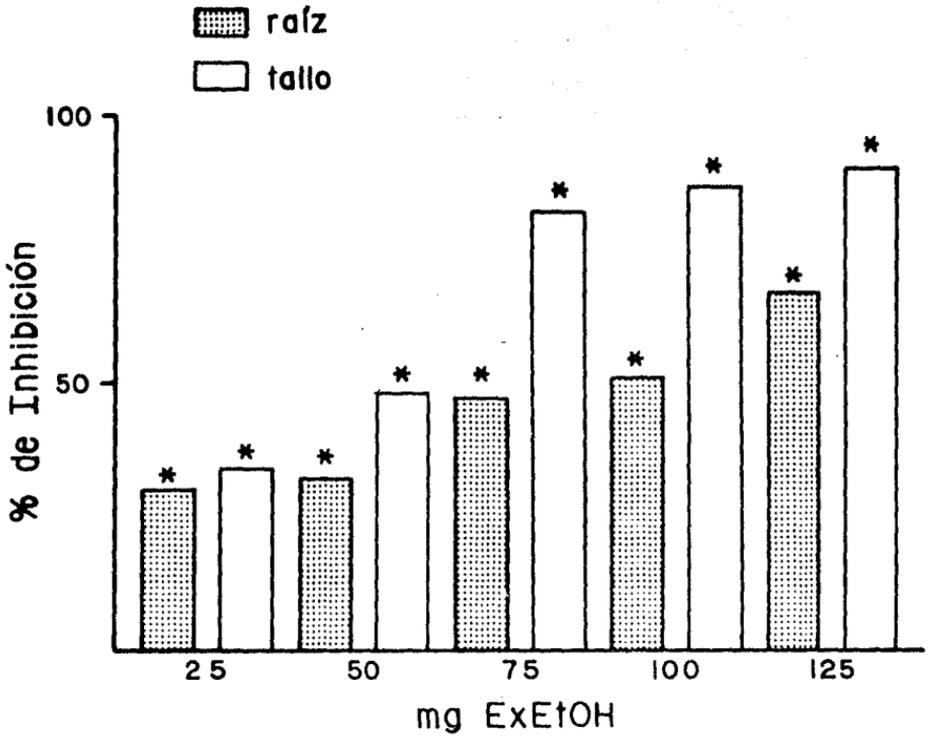
R E P E T I C I O N E S						
TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	Total
Testigo H <sub>2</sub> O	4.3	4.1	3.7	4.6	3.6	20.3
ExEtOH 25 mg	2.3	3.5	1.1	3.5	3.2	13.6
ExEtOH 50 mg	3.0	1.4	2.2	2.2	1.5	10.3 *
ExEtOH 75 mg	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	3.7 *
ExEtOH 100 mg	0.4	0.5	0.4	0.8	0.4	2.5 *
ExEtOH 125 mg	0.4	0.6	0.2	0.5	0.3	2.0 *
Total	11.1	10.8	8.3	12.4	9.8	52.4

(los datos se dan en centímetros)

Tabla de Anova:

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	4	1.59	0.39	1.85
Tratamientos	5	53.9	10.78	51.3 *
Error Experimental	25	5.3	0.21	

\* F significativa al 1%



\* F Significativa al 1% con respecto al control

Figura 8. Efecto de cinco concentraciones de Extracto etanólico de polen de Zea mays sobre el crecimiento de la raíz y del tallo de Citrullus lanatus.

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS FITOTOXICOS DEL POLEN DE ZEA MAYS  
SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE CITRULUS LANATUS.

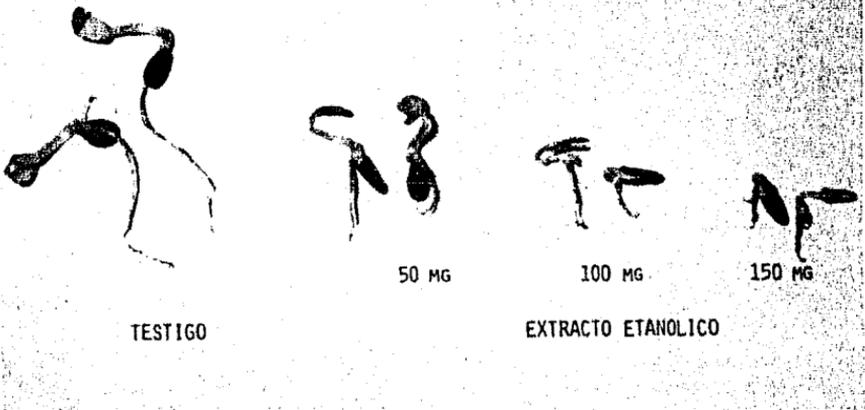


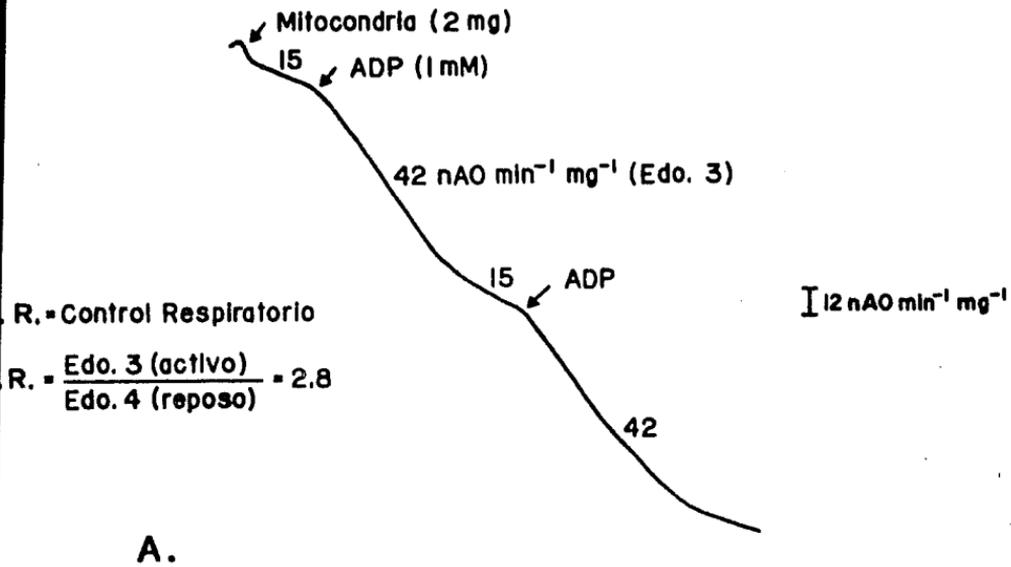
Figura 9. Bioensayo con extracto etanólico de polen de Zea mays.  
La concentración de 150 mg no se discute en este  
trabajo.

#### IV.2. Efectos sobre la respiración celular en mitocondrias aisladas de hipocótilos de Citrullus lanatus.

En la Figura 10 se muestran los trazos de consumo de oxígeno de la suspensión mitocondrial. En el primer trazo (10-A) se observa un control respiratorio (C.R. = 2.8) con malato-glutamato como sustrato. Este control resulta de dividir el estado 3 ó consumo de oxígeno en presencia de ADP entre el estado 4 ó consumo de oxígeno sin ADP. Este dato nos proporciona una medida de la integridad y del acoplamiento de las mitocondrias.

En la Figura 10-B se observa el efecto de 250  $\mu$ g de extracto etanólico de Zea Mays (éste se disolvió en alcohol etílico (Merck) con el que se realizó un control) sobre la oxidación de malato-glutamato. Se observó una inhibición del consumo de oxígeno y al adicionar una alícuota de ADP, no hubo una estimulación del consumo de oxígeno, como en el control. Esta inhibición no es atenuada por un desacoplante conocido como el DNP; el extracto etanólico actuó como un inhibidor de la transferencia de electrones, o sea, que previene la estimulación de consumo de oxígeno por el ADP y la fosforilación del ADP a ATP. Sin embargo, al adicionar al medio 10 mM de succinato, se observó un incremento del consumo de oxígeno (Figura 10-B); se sabe que este sustrato entra a la cadena de transporte de electrones a nivel de la Ubiquinona (Co.Q) o sitio II de producción de energía.

En la Tabla 4 se observa que el consumo de oxígeno en estado 3, con malato-glutamato como sustrato, disminuye conforme aumenta la concentración del extracto etanólico (Figura 11), el porcentaje de inhibición va en aumento con respecto al control (Figura 12).



CONTROL RESPIRATORIO. Con Glutamato - Malato 10 mM como sustrato

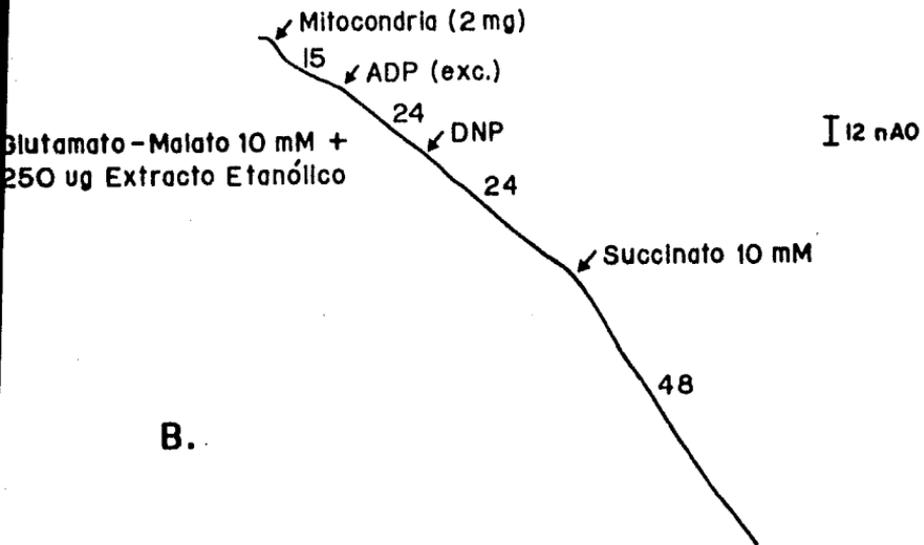


Figura 10. Trazos de consumo de oxígeno por mitocondrias de *Citrullus lanatus*. A: Control Respiratorio. B: Efecto de 250 µg de ExEtOH con Malato-Glutamato como sustrato. Los números sobre los trazos se refieren a los nano moles de oxígeno consumido por min. por mg de proteína.

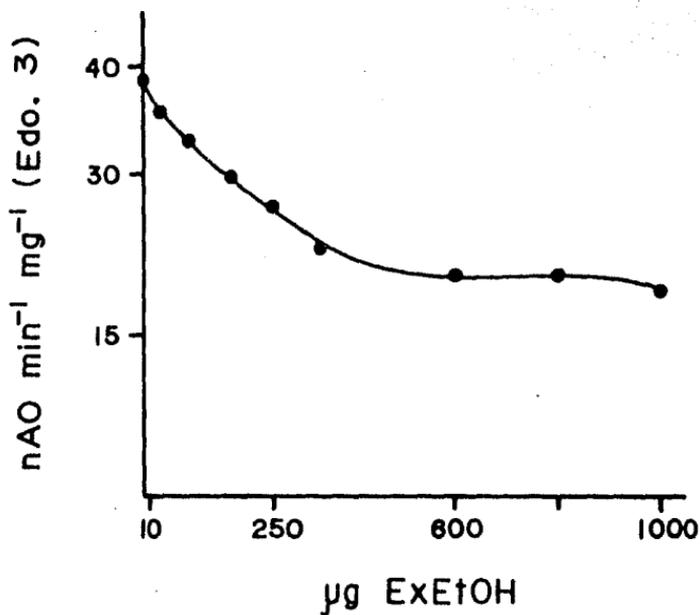


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de ExEtOH sobre el consumo de oxígeno (nAO/min/mg) por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus con malato-glutamato como sustrato.

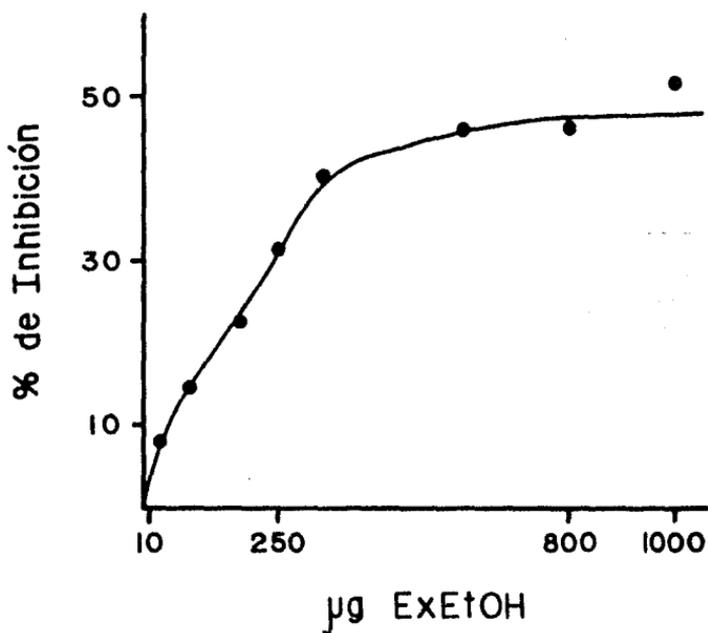


Figura 12. Curva de inhibición del consumo de oxígeno (estado 3) por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus, con malato-glutamato como sustrato.

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico sobre el consumo de oxígeno en estado 3 con malato-glutamato como sustrato por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus.

Extracto etanólico (µg)	Consumo de oxígeno (nAO/min/mg edo. 3)	Porcentaje Inhibición
0	39	0
33.3	36	8.0
83.3	33	15.0
166.0	30	23.0
250.0	27	31.0
333.0	23	41.0
600.0	21	46.0
800.0	21	46.0
1000.0	19	52.0

En la figura 13 se muestran los siguientes trazos de consumo de oxígeno:

- 13.A. En este trazo se muestra un control con malato-glutamato como sustrato. Al añadir ADP en exceso hubo una estimulación del consumo de oxígeno (42 nAO/min/mg).
- 13.B. Al medio de respiración con malato-glutamato, se le adicionó 60 µg de extracto etanólico, con lo que se obtuvo una inhibición cerca del 50%, el consumo de oxígeno en estado 3 disminuyó de 42 nAO/min/mg a 24 nAO/min/mg. Al adicionar al medio succinato (10 mM), el consumo de oxígeno se estimuló a 57 nAO/min/mg.
- 13.C. En este trazo se observa que al adicionar 600 µg de extracto etanólico, después de que el consumo de oxígeno se estimuló con ADP, se produjo una inhibición del consumo de oxígeno (de 42 nAO/min/mg a 24 nAO/min/mg).

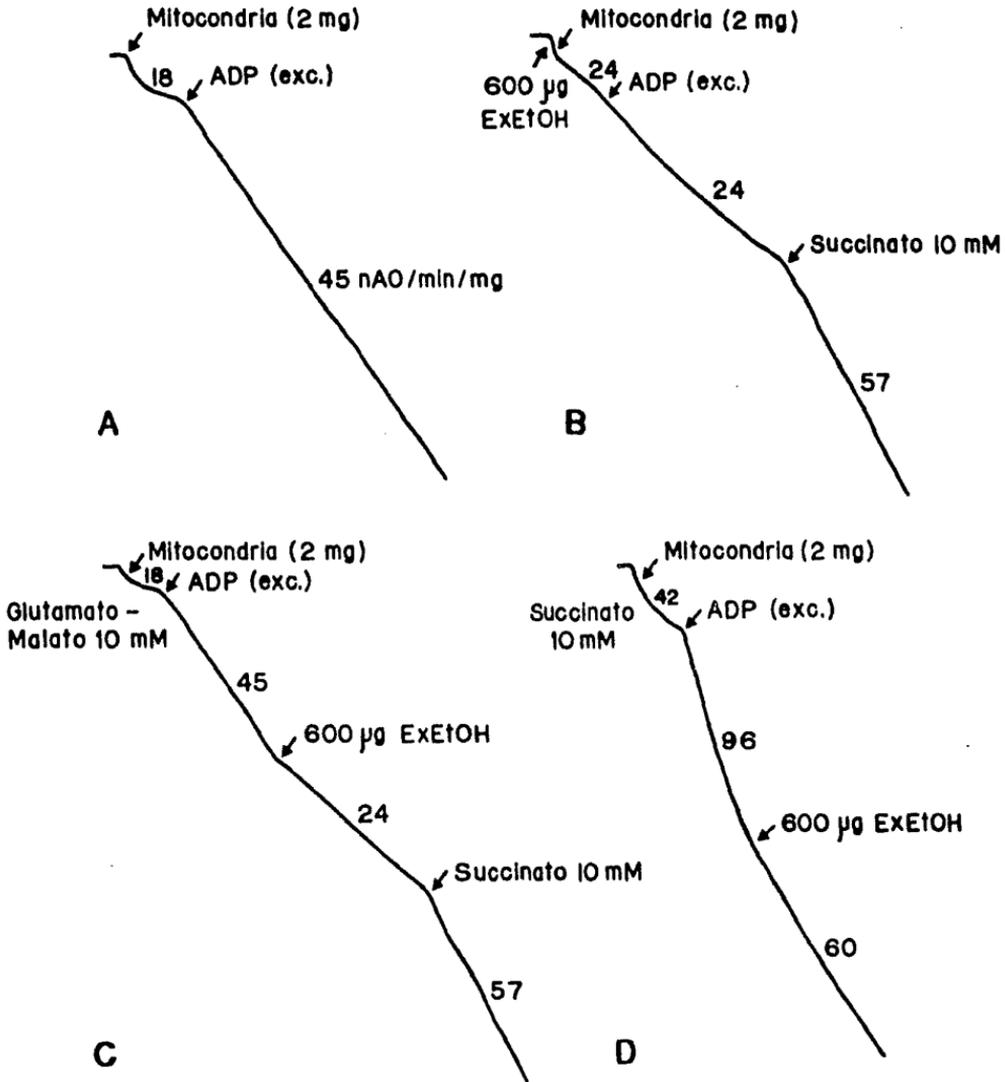


Figura 13. Trazos de consumo de oxígeno por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus con malato-glutamato y succinato como sustratos.

13.D. En este trazo se utilizó succinato (10 mM) como sustrato, el consumo de oxígeno estimulado con ADP fue de 96 nAO/min/mg, al adicionar 600 µg de extracto etanólico, el consumo de oxígeno disminuyó a 60 nAO/min/mg. Esta inhibición nos llevó a probar el efecto de varias concentraciones de extracto etanólico sobre este sustrato.

Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de polen de Zea mays sobre el consumo de oxígeno en estado 3 con succinato como sustrato por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus.

Extracto etanólico (µg)	Consumo de oxígeno (nAO/min/mg edo. 3)	Porcentaje inhibición
0	99.7	0
33.3	93.8	5.8
83.3	89.4	10.3
166.6	81.7	18.0
250.0	76.5	23.2
333.0	75.8	24.0
600.0	67.8	35.0
800.0	59.1	42.0
1000.0	48.0	52.0

La Tabla 5 muestra que el consumo de oxígeno en el estado 3 disminuyó conforme aumenta la concentración de extracto etanólico (Figura 14), mientras que el porcentaje de inhibición aumenta (Figura 15).

Como se observa en la Tabla 6, la inhibición provocada por el extracto etanólico sobre la oxidación del succinato es menor que aquélla sobre malato-glutamato, no obstante con las concentraciones mayores (800 y 1000 µg) la inhibición tiende a ser igual.

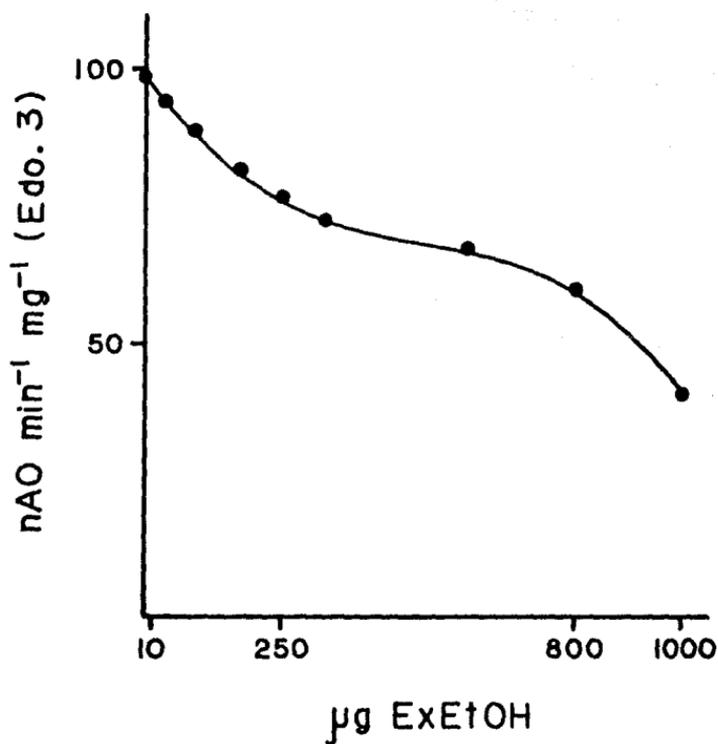


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de ExEtOH sobre el consumo de oxígeno (estado 3) en mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus con succinato como sustrato.

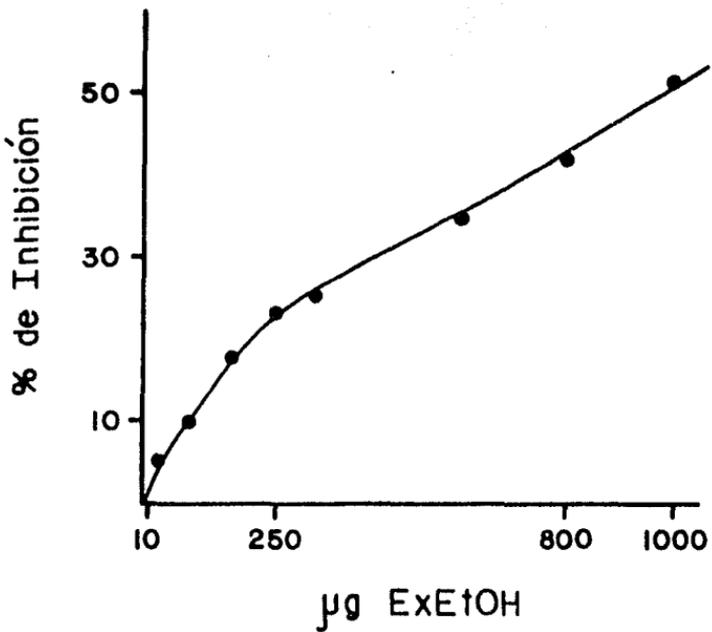


Figura 15. Curva de inhibición del consumo de oxígeno (estado 3) por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus, con succinato como sustrato.

TABLA 6. Comparación en los porcentajes de inhibición causados por el extracto etanólico del polen de Zea mays sobre la oxidación de malato-glutamato y succinato.

Extracto Etanólico ( $\mu$ g)	Porcentaje de Inhibición	
	Malato-glutamato (10mM)	Succinato (10mM)
33.3	8.0	5.8
83.3	15.0	10.3
166.6	23.0	18.0
250.0	31.0	23.2
333.0	41.0	24.0
600.0	46.0	35.0
800.0	46.0	42.0
1000.0	52.0	52.0

Con el fin de conocer si el extracto etanólico inhibía a nivel de la coenzima Q ó ubiquinona de la cadena de transporte de electrones, se utilizó la menadiona o vitamina K, la cual es una ubiquinona. En la Figura 16, en los trazos A y B se puede observar que no se restableció el consumo de oxígeno al adicionar la menadiona; en cambio, en el trazo C y Figura 17 se observa que al adicionar TMPD (ascorbato-tetrametil-para-fenil-diamina), el consumo de oxígeno se estimula y el extracto etanólico no tiene efecto sobre la vía respiratoria con este sustrato. Se sabe que el TMPD cede electrones en la cadena respiratoria a nivel de citocromo "c", localizado en la superficie externa de la membrana interna. Consecuentemente, el sitio de inhibición del extracto etanólico del polen de Zea mays se encuentra antes del citocromo "c", entre la ubiquinona o coenzima Q y el citocromo "c", en la cadena de transporte de electrones.

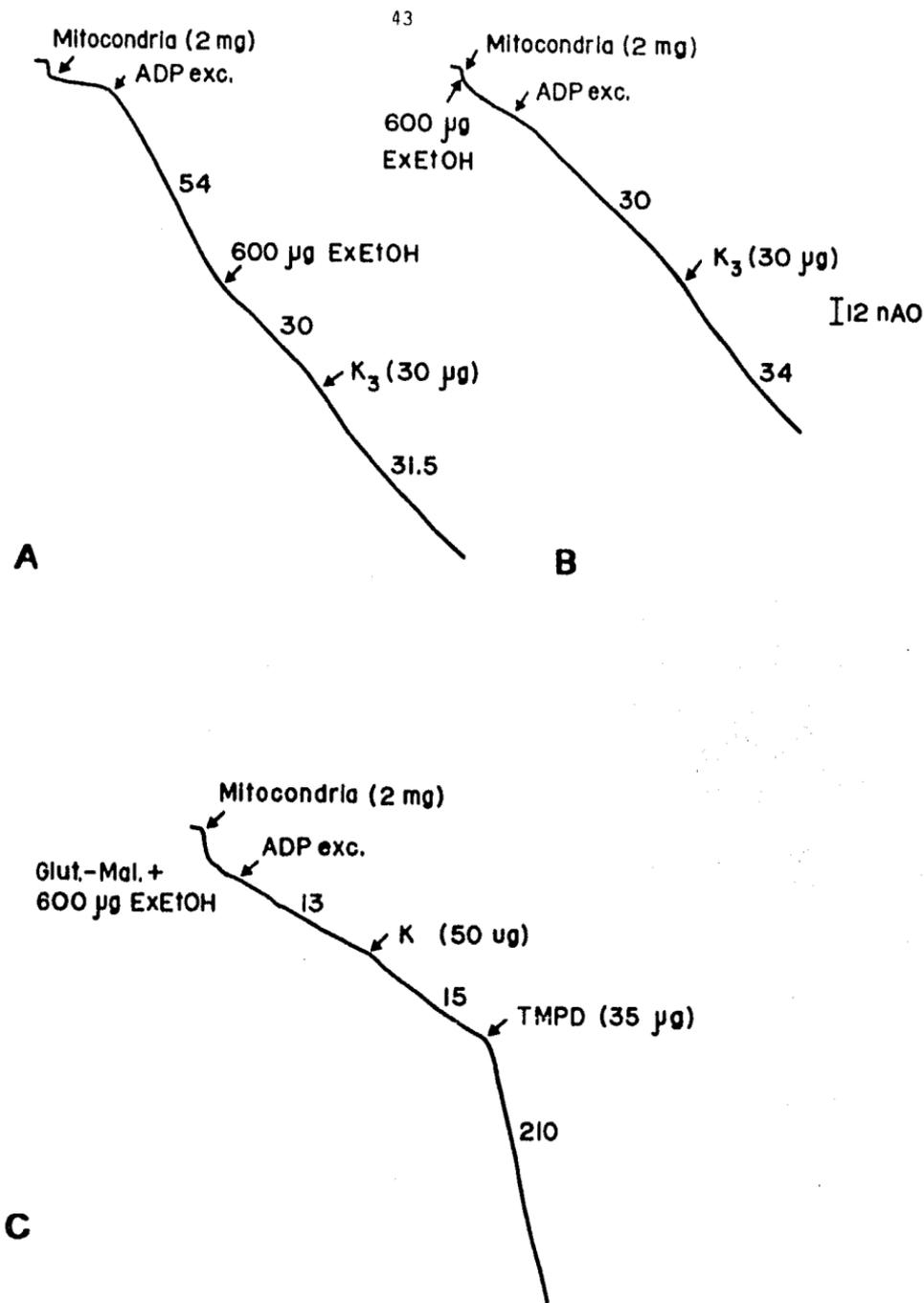


Figura 16. Trazos de consumo de oxígeno por mitocondrias de *Citrullus lanatus* con Malato-glutamato (A), con Menadiona o vitamina K (B) y con TMPD (C).

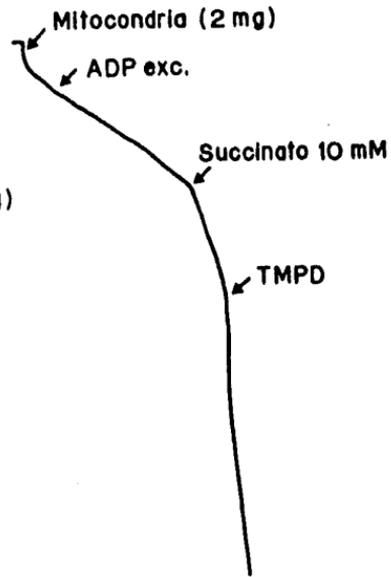
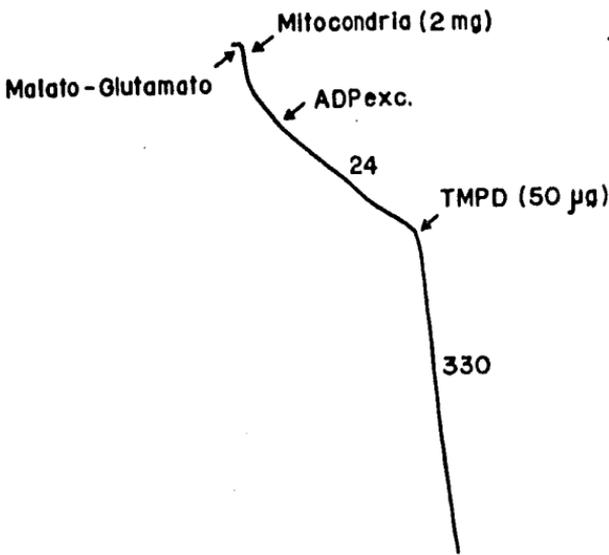
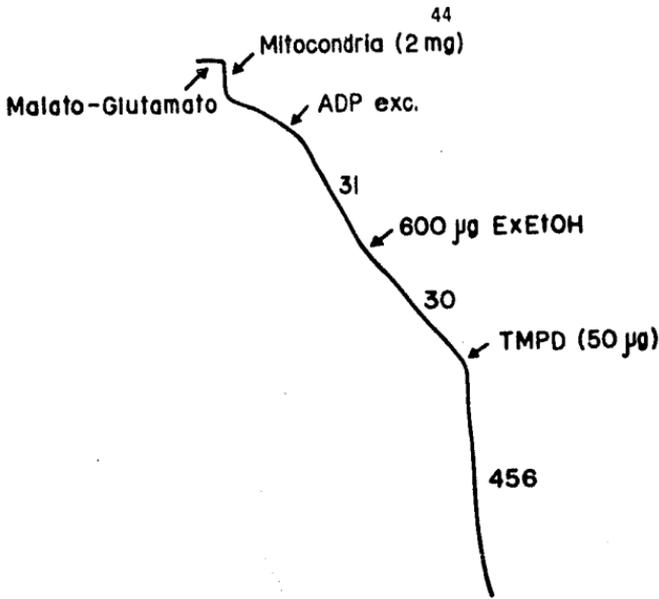


Figura 17. Trazos de consumo de oxígeno por mitocondrias aisladas de Citrullus lanatus, con TMPD.

En partículas submitocondriales en donde la superficie interna de la membrana interna queda expuesta, el extracto etanólico no tuvo efecto sobre la oxidación del NAOH, como se observa en la Figura 18.

#### IV.3. Efectos sobre la división celular en meristemas radiculares de Citrullus lanatus.

Los resultados sobre los efectos del polen de Zea mays y del extracto etanólico del mismo, muestran una inhibición de la división celular en células meristemáticas de plantas de Citrullus lanatus tratadas.

En la Tabla 7 y Figura 21 se muestran los efectos del polen espolvoreado sobre las semillas de Citrullus lanatus; el Índice Mitótico disminuyó desde la concentración de 50 mg de polen. La prueba estadística de diferencia de proporciones mostró una diferencia significativa entre el testigo y los tratamientos, sin embargo no hubo una gran diferencia entre las tres concentraciones de polen. En las preparaciones de los meristemas tratados también se encontró una destrucción del tejido meristemático. Las fotografías correspondientes se muestran en la Figura 19.

La Tabla 8 muestra los efectos del extracto etanólico sobre las células meristemáticas. El Índice Mitótico disminuyó conforme aumentó la concentración de extracto etanólico. La prueba estadística de diferencia de proporciones mostró una diferencia significativa entre los tratamientos. Además de la inhibición del Índice Mitótico, las células de las raíces tratadas mostraron una destrucción del núcleo o pycnosis; esto fue más frecuente en las concentraciones mayores, aunque también se observaron en la de 50 mg. Las fotografías correspondientes se muestran en la Figura 20.

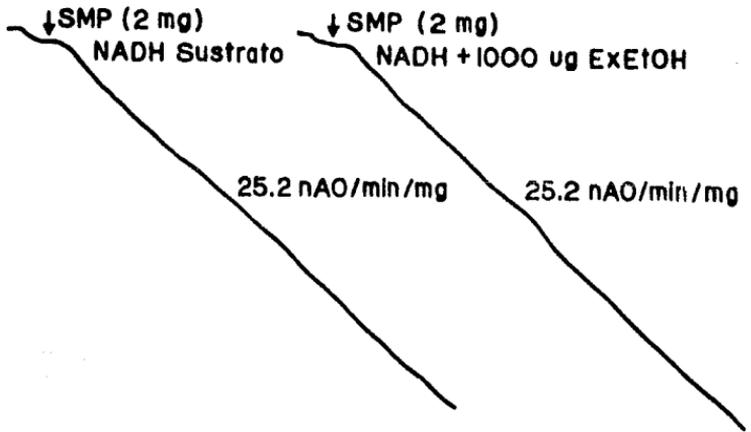


Figura 18. Efecto del extracto etanólico sobre partículas submitocondriales con NADH como sustrato.

TRATAMIENTO	TOTAL DE INTERFASES	TOTAL DE PROFASES	TOTAL DE METAFASES	TOTAL DE ANAFASES	TOTAL DE TELOFASES	TOTAL DE FIGURAS	INDICE MITOTICO (%)
TESTIGO	912	41	14	20	13	88	8.8
Polen Espolvoreado 50 mg	974	10	4	9	3	26	2.6
Polen Espolvoreado 100 mg	980	10	5	5	0	20	2.0
Polen Espolvoreado 150 mg	987	9	3	1	0	13	1.3

Z ( $\alpha = 0.001$ )

Tabla 7. Índices mitóticos (I.M.) obtenidos con polen espolvoreado de Zea mays, en las células meristemáticas de la raíz de Citrullus lanatus.

TRATAMIENTO	TOTAL DE INTERFASES	TOTAL DE PROFASES	TOTAL DE METAFASES	TOTAL DE ANAFASES	TOTAL DE TELOFASES	TOTAL DE FIGURAS	INDICE MITOTICO (%)
TESTIGO	908	45	15	23	9	92	9.2
ExEtOH 25 mg	930	21	15	29	5	70	7.0
ExEtOH 50 mg	951	26	7	15	1	49	4.9
ExEtOH 75 mg	967	12	6	15	0	33	3.3
ExEtOH 100 mg	983	7	4	6	0	17	1.7
ExEtOH 150 mg	985	7	3	5	0	15	1.5

Z ( $\alpha = 0.001$ )

Tabla 8. Índices mitóticos (I.M.) obtenidos con cinco concentraciones de extracto etanólico de polen de Zea mays, en las células meristemáticas de Citrullus lanatus.

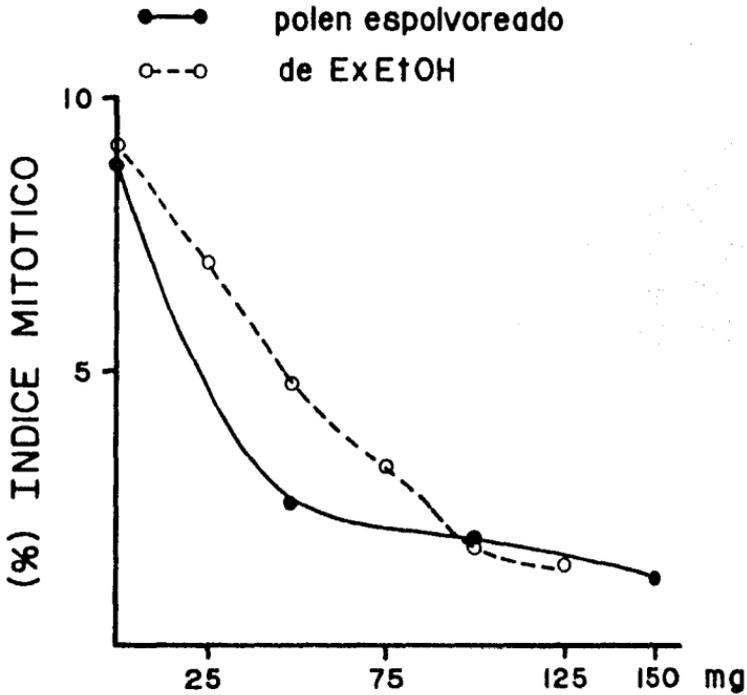


Figura 21. Índice Mitótico en las células meristemáticas de la raíz de *Citrullus lanatus* tratadas con polen y con extracto etanólico del mismo.

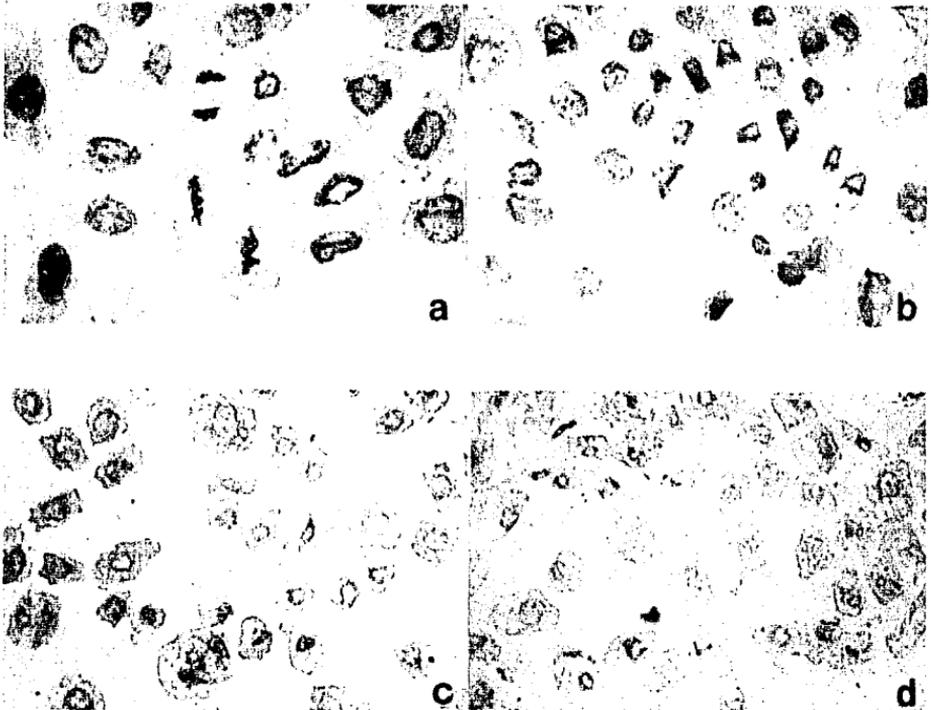


Figura 19. Apariencia de las células meristemáticas de Citrullus lanatus tratadas con polen de Zea mays espolvoreado.  
a: Testigo. b: 50 mg. c: 100 mg. d: 150 mg.

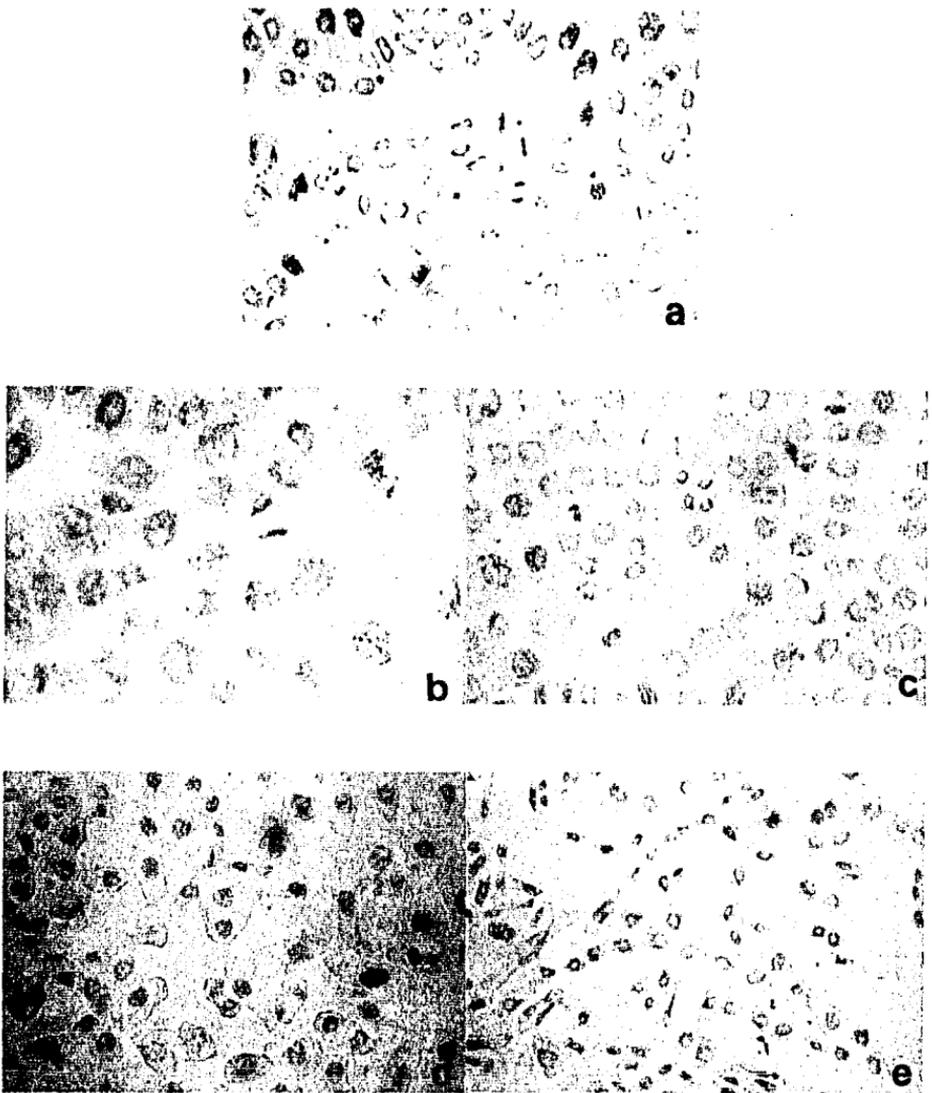


Figura 20. Apariencia de las células meristemáticas de Citrullus lanatus tratadas con diferentes concentraciones de extracto etanólico. a: Testigo. b: 25 mg. c: 50 mg. d: 100 mg. e: 125 mg.

## V. DISCUSION

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se confirma que el polen de maíz (Zea mays) contiene compuestos fitotóxicos que afectan el crecimiento y el desarrollo vegetal (Jiménez et al, 1981 y 1983). Los bioensayos realizados en el laboratorio con el polen de maíz y el extracto etanólico del mismo causaron una inhibición del crecimiento de la raíz y del tallo de las plántulas de sandía (Citrullus lanatus). De trabajos realizados en el laboratorio de Ecología Química del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Hernández (comunicación personal), atribuye la actividad fitotóxica del polen de maíz a la presencia de compuestos fenólicos como: el ácido p-cumárico, el ácido p-hidroxibenzoico y la hidroquinona, identificados en el extracto etanólico. Los compuestos fenólicos son identificados con frecuencia como inhibidores del crecimiento y la germinación en los estudios sobre interacciones alelopáticas. Guenzi y McCalla (1966) reportaron que en suelos con residuos de maíz, trigo, sorgo y avena, se encontraron presentes los ácidos p-hidroxibenzoico, p-cumárico, vainillínico y gálico. Se tiene información general sobre la actividad inhibidora de los compuestos fenólicos pero se conoce poco acerca de los aspectos fisiológicos de cómo afectan estos compuestos el crecimiento vegetal (Kefeli y Kadyrov, 1971).

La inhibición del crecimiento de la raíz y del tallo de la sandía causada por el extracto etanólico, podría ser explicada por los efectos que el extracto etanólico tuvo sobre la respiración y por lo tanto sobre la producción de energía. Los resultados observados en mitocondrias aisladas de hipocótilos de sandía, muestran que el extracto etanólico actúa como un inhibidor de la cadena de transporte de electrones (Figura 10).

El porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno aumenta conforme la concentración de extracto etanólico es mayor, con malato-glutamato y con succinato como sustratos (Figuras 12 y 15). En estas mismas figuras, así como en la Tabla 6, se puede observar que la inhibición del consumo de oxígeno con concentraciones bajas de extracto etanólico al utilizar malato-glutamato como sustrato es mayor a diferencia de la observada con succinato como sustrato. Sin embargo, a concentraciones mayores, el porcentaje de inhibición es casi el mismo. Ikuma y Bonner (1967) y Palmer (1976) mencionan que las mitocondrias vegetales oxidan el succinato a una velocidad mayor que el malato; al ser el consumo de oxígeno más rápido con succinato, el inhibidor no alcanza a bloquear el sitio correspondiente en la cadena de transporte de electrones. También se sabe que el succinato entra a nivel de la coenzima Q y el malato entra desde la NADH deshidrogenasa.

El sitio probable de acción del extracto etanólico en la cadena de transporte de electrones, se encuentra desde el citocromo "b", hasta un sitio anterior al citocromo "c", como lo demuestran los experimentos donde se observa que al adicionar una ubiquinona sintética como la menadiona o vitamina K (Figura 16), no hay un restablecimiento del consumo de oxígeno, como se podría esperar si el compuesto estuviera actuando a nivel de la coenzima Q. Sin embargo, al adicionar ascorbato-tetrametil-para-fenil-diamina (TMPD) como sustrato (Figuras 16 y 17), el extracto etanólico no tiene efecto sobre la tasa de respiración de este sustrato. Se sabe que el TMPD cede electrones a nivel del citocromo "c", el cual se encuentra en la cara externa de la membrana interna. Consecuentemente, el sitio de inhibición del extracto etanólico es anterior al citocromo "c". Douce et al (1978), encontraron en mitocondrias de frijol, que el  $\beta$ -pineno ejerce una acción desacoplante a concentraciones altas y que su sitio probable de inhibición es anterior al cito

cromo "c", a nivel del complejo de la coenzima Q.

Con los experimentos realizados, no se puede decir con certeza cómo podría estar actuando el extracto etanólico, si como un inhibidor de óxido-reducción, captando los electrones, o bien, pegándose a algún acarreador de la cadena de transporte de electrones. En ambos casos se produce una inhibición del flujo de electrones a través de los acarreadores. El hecho de que el extracto etanólico no haya tenido efecto en partículas submitocondriales, sugiere que el extracto etanólico se está pegando al citocromo  $c_1$ , el cual se localiza, en este caso, en el interior de las partículas submitocondriales.

También es necesario comprobar si los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico alteran la fluidez de la membrana. Siedow y col. (1978) comentan que un compuesto análogo a la dibromoquinona disminuye la fluidez de ésta, y sugieren que la inhibición de la transferencia de electrones está asociada con este efecto. Moreland y Huber (1978) atribuyen los efectos de varios herbicidas probados sobre mitocondrias de frijol, a una disminución en la fluidez y a un aumento en la permeabilidad de la membrana y no a una interacción directa con alguno de los componentes de la cadena de transporte de electrones, por lo que algunos inhibidores lipofílicos actúan de una manera no específica.

Para conocer el sitio de inhibición y la forma de acción del extracto etanólico en la cadena de transporte de electrones sería necesario un estudio bioquímico más profundo y la utilización de técnicas más complejas.

Por otra parte, al existir una inhibición en la cadena de transporte de electrones, se previene la estimulación del consumo de oxígeno por la adición del ADP y su fosforilación a ATP, y por lo tanto la producción de energía disponible para otros procesos celulares se ve disminuída.

Los resultados obtenidos sobre el proceso de mitosis muestran un efecto inhibitorio sobre la división celular de células meristemáticas de la raíz de sandía. El índice mitótico disminuye considerablemente en las raíces tratadas con polen espolvoreado y con el extracto etanólico (Tablas 7 y 8). Otra alteración que presentaron las células meristemáticas tratadas, fue la presencia de núcleos picnóticos en preparaciones fijas, los cuales son una indicación de muerte celular (Ham y Leeson, 1965).

Kilhman (1966) considera que los agentes químicos que provocan inhibición de la división celular, pueden actuar de dos maneras: al afectar la síntesis o la estructura del ADN y/o ARN, y/o al inhibir la producción de energía requerida para la mitosis. La síntesis de ADN y la fosforilación oxidativa son eventos importantes para la división celular, por lo que cualquier alteración en esos eventos generalmente causa la inhibición del proceso.

La reducción de la actividad mitótica o una interrupción en alguna etapa del desarrollo temprano pueden restringir el crecimiento posterior de la planta, que depende necesariamente de este proceso de división celular.

Consideramos que no sólo estos dos procesos celulares, la respiración y la mitosis, pueden ser la razón fisiológica principal de la inhibición causada por el polen de maíz sobre el crecimiento de las plántulas de sandía. También pueden estar involucrados otros procesos, como por ejemplo el paso de los compuestos a través de las membranas celulares, el transporte de iones, la síntesis de proteínas y otros.

Sin embargo, los dos procesos celulares estudiados son eventos importantes durante la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas. Se ha observado que el período de germinación va acompañado de un incremento en el desarrollo mitocondrial y por consiguiente de la actividad respiratoria (Nawa y Asahi, 1971; Solomos et al, 1972; Sato y Asahi, 1975). Esta etapa

inicial también es importante por la susceptibilidad que presentan las semillas hacia los factores externos, los cuales pueden determinar su establecimiento y desarrollo posterior. No obstante, los efectos de los compuestos alelopáticos no sólo se manifiestan inhibiendo la germinación y el crecimiento inicial, sino que también en plántulas adultas ya establecidas se ha observado un retraso o ausencia de la floración y en la fructificación, los cuales obtienen su energía principalmente del proceso de la fotosíntesis, por lo cual sería interesante estudiar los efectos de los compuestos fitotóxicos del polen de maíz sobre la cadena fotosforilante de los cloroplastos.

Los trabajos realizados sobre los efectos de los compuestos alelopáticos en los procesos celulares como la respiración y la división celular (Muller et al, 1968; Muller et al, 1969; Koeppe, 1972; Demos et al, 1975; Van Sumere et al, 1972, y otros), permiten concluir que los efectos sobre estos procesos pueden representar un importante mecanismo de acción para la inhibición del crecimiento de las plantas.

Los resultados que se obtienen de este tipo de estudios son necesarios para complementar la evaluación de los compuestos alelopáticos en la naturaleza y para proponer formas de utilización de los mismos en el control de plagas y de malezas.

## VI. CONCLUSIONES

- Se encontró que los compuestos fitotóxicos presentes en el polen de Zea mays y en un extracto etanólico del mismo causan una inhibición del crecimiento de las plántulas de Citrullus lanatus.
- El extracto etanólico del polen de Zea mays actuó como un inhibidor de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias aisladas de hipocótilos de Citrullus lanatus.
- Se inhibió el estado 3 que depende de ADP con malato-glutamato y con succinato como sustratos.
- El sitio de acción probable del extracto etanólico en la cadena de transporte de electrones es anterior al citocromo c.
- El Índice Mitótico disminuyó en células meristemáticas de raíz de Citrullus lanatus tratadas con polen espolvoreado y con extracto etanólico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allen, P. 1973. Toxins and Tissue Respiration. *Phytopathol.* 43: 221-229.
2. Avers, Ch. y Goodwin, R.H. 1956. Studies in Roots. IV. Effects of Coumarin and Scopoletin on the Standard Root Growth Pattern of *Phleum pratense*. *Amer. J. Bot.* 43; 612-620.
3. Corman, I. 1946. Alteration of Mitosis by Coumarin and Parascorbic Acid. *Amer. J. Bot.* 33: 217.
4. Conger, A.D. y Fairchild, L.M. 1953. A Quick-freeze Method for Making Smear Slides Permanent. *Stain Technol.* 28: 281-283.
5. Cronquist, A. 1975. Introducción a la Botánica (2a Ed.) CECSA, México. pp. 848.
6. Day, D.A., Arron, G.P. y Laties, G.C. 1980. Nature and Control of Respiratory Pathways in Plants: The Interaction of Cyanide-resistant Respiration with the Cyanide-sensitive Pathway. In: Davis, D.D. (ed.), *The Biochemistry of Plants*. Vol. 2. Academic Press, N.Y. pp. 197-241.
7. Demos, E.K., Woolwine, M., Wilson, R.H. y McMillan, C. 1975. The Effects of Ten Phenolic Compounds on Hypocotyl Growth and Mitochondrial Metabolism of Mung Beans. *Amer. J. Bot.* 62(1): 97-102.
8. Douce, R., Mannella, C.A. y Bonner Jr., W.D. 1973. The External NADH Dehydrogenases of Intact Plant Mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* 292; 105-116.

9. Douce, R., Neuburger, M., Bligny, R. y Pauly, G. 1978. Effects of  $\beta$ -pineno on the Oxidative Properties of Purified Intact Plant Mitochondria. In: Ducet, G. y C. Lance (eds.), Plant Mitochondria. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 207-214.
10. Elthon, T.E. y Stewart, C.R. 1983. A Chemiosmotic Model for Plant Mitochondria. Bio. Science 33(11): 687-692.
11. Friedman, J. y Waller, G.R. 1983. Caffeine Hazards and Their Prevention in Germinating Seeds of Coffee (Coffea arabica L.). J. Chem. Ecol. 9(8):1099-1106.
12. Gauvrit, C. 1978. Effects of Some Substituted Urea-herbicides on Oxidative Phosphorilation in Potato Tuber Mitochondria (Solanum tuberosum L.). In: Ducet, G. y C. Lance (eds.), Plant Mitochondria. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 199-206.
13. Grodzinsky, A.M. 1965. Allelopathy in the Life of Higher Plants. Naukova Dumka. Kiev.
14. Guenzi, W.D. y McCalla, T.M. 1966. Phenolic Acids in Oats, Wheat, Sorghum, and Corn Residues and Their Phytotoxicity. Agron. J. 58: 303-304.
15. Ham, A.W. y Leeson, T.S. 1965. Histología (4a Ed.) Interamericana.
16. Hanson, J.B. y Day, D.A. 1980. Plant Mitochondria. In: Tolbert, N.E. (ed.), The Biochemistry of Plants. Vol. I. Academic Press, N.Y. pp. 315-358.
17. Hernández, R.J. Comunicación personal.
18. Horsley, S.B. 1977. Allelopathic Interference Among Plants. II. Physiological Modes of Action. In: Proceedings of the Fourth North American Forest Biology. Workshop. pp. 93-136. H.E. Wilcox y A.F. Hamer (eds.). School of Continuing Education College of Environmental Science and Forestry, N.Y.

19. Ikuma, H. y Bonner Jr., W.D. 1967. Properties of Higher Plant-Mitochondria. I. Isolation and Some Characteristics of Tightly-Coupled Mitochondria from Dark-grown Mung Bean Hypocotyls. Proc. S. Dak. Acad. Sci. 41: 67-75.
20. Jensen, T.W. y Welbourne, F. 1962. The Cytological Effects of Growth Inhibitors on Excised Roots of Vicia faba and Pisum sativum. Proc. S. Dak. Acad. Sci. 41: 131-136.
21. Jiménez, J.J. y Schultz, K.C. 1981. Relaciones Cultivo-Arvenses en una Chinampa. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. UNAM, México, D.F.
22. Jiménez, J.J., Schultz, K., Anaya, A.L., Hernández, J. y Espejo, O. 1983. Allelopathic Potential of Corn Pollen. J. of Chem. Ecol. 9(8): 1011-1025.
23. Kefeli, V.I. y Kadyrov, Ch.Sh. 1971. Natural Growth Inhibitors, Their Chemical and Physiological Properties. Annu. Rev. Plant Physiol. 22: 185-196.
24. Killman, B.A. 1966. Actions of Chemicals on Dividing Cells. Prentice Hall. New Jersey.
25. Koeppe, D.E. 1972. Some Reactions of Isolated Corn Mitochondria Influenced by Juglone. Physiol. Plant. 27: 89-94.
26. Koeppe, D.E. y Miller, R.J. 1974. Kaempferol Inhibitions of Corn Mitochondrial Phosphorylation. Plant Physiol. 54: 374-378.
27. Lang, D.R. y Racker, E. 1974. Effects of Quercetin and  $F_1$  Inhibitor on Mitochondrial ATP-ase and Energy-linked Reactions in Submitochondrial Particles. Biochim. Biophys. Acta 333: 180-186.
28. Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randam, R.J. 1951. Protein Measurements with the Folin Fenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

29. Moore, A.L. 1978. The Electrochemical Gradient of Protons in Plant Mitochondria. In: Ducet, G. y C. Lance (eds.), Plant Mitochondria. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 85-93.
30. Moore, A.L. y Rich, P.R. 1980. The Bioenergetics of Plant Mitochondria. Trends Biochem. Sci. November: 284-288.
31. McCahon, Ch.B., Kelsey, R.G., Sheridan, R.P. y Shafizadeh, F. 1973. Physiological Effects of Compounds Extracted from Sagebrush. Bull. Torrey. Bot. Club. 100: 23-28.
32. Moreland, D. y Huber, S.C. 1978. Fluidity and Permeability Changes Induced in the Inner Mitochondrial Membrane by Herbicides. In: Ducet, G. and C. Lance (eds.), Plant Mitochondria. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
33. Muller, W.H. 1965. Volatile Materials Produced by Salvia leucophylla: Effects on Seedling Growth and Soil Bacteria. Bot. Gaz. 121(3): 195-200.
34. Muller, W.H. y Hauge, R. 1967. Volatile Growth Inhibitors Produced by Salvia leucophylla: Effect on Seedling Anatomy. Bull. Torrey. Bot. Club. 94: 182-191.
35. Muller, W.H., Lorber, P., Haley, B. y Johnson, K. 1969. Volatile Growth Inhibition Produced by Salvia leucophylla: Effect on Oxygen Uptake by Mitochondrial Suspensions. Bull. Torrey. Bot. Club. 96: 89-95.
36. Muller, W.H., Lorber, P. y Haley, B. 1968. Volatile Growth Inhibitors Produced by Salvia leucophylla: Effect on Seedling Growth and Respiration. Bull. Torrey. Bot. Club. 95: 415-422.
37. Nawa, Y. y Asahi, T. 1971. Rapid Development of Mitochondria in Pea Cotyledons During the Early Stage of Germination. Plant Physiol. 48: 671-674.

38. Palmer, J.M. 1976. The Organization and Regulation of Electron Transport in Plant Mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 133-157.
39. Patrick, Z.A. y Koch, L.W. 1958. Inhibition of Respiration, Germination and Growth by Substances Arising During the Decomposition of Certain Plant Residues in the Soil. *Can. J. Bot.* 36: 621-647.
40. Peña, A., Alvarez, R. y Uribe, S. 1982. Comunicación personal.
41. Putnam, A.L. 1983. Allelopathic Chemical Nature's Herbicides in Action. *News. C. and En.* 34-44.
42. Rice, E.L. 1974. *Allelopathy*. Academic Press, N.Y.
43. Rice, E.L. 1979. Allelopathy - An Update. *Bot. Rev.* 45(1): 15-109.
44. Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*. 2nd Ed. Academic Press, N.Y.
45. Sato, S. y Asahi, T. 1975. Biochemical Properties of Mitochondrial Membrane from Dry Pea Seeds and Changes in the Properties During Inhibition. *Plant Physiol.* 56: 816-820.
46. Siedow, J.N., Stevin, C. y Moreland, D.E. 1978. Inhibition of Mung Bean Mitochondrial Electron Transfer by Debromothymoquinone. In: Ducet, G. y C. Lance (eds.), Plant Mitochondria. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 233-240.
47. Stenlid, G. 1970. Flavonoids as Inhibitors of the Formation of Adenosin Triphosphate in Plant Mitochondria. *Physiol. Plant* 9: 2251-2256.
48. Storey, B.T. 1980. Electron Transport and Energy-Coupling in Plant Mitochondria. In: D.D. Davis (ed.), The Biochemistry of Plants. Vol. 2. Academic Press, N.Y. pp. 125-195.

49. Swain, T. 1977. Secondary Compounds as Protective Agents. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 479-501.
50. Solomos, T., Malhotra, S.S., Prasad, S., Malhotra S.K. y Spencer, M. 1972. Biochemical and Structural Changes in Mitochondria and Other Cellular Components of Pea Cotyledons During Germination. *Can. J. of Biochem.* 50: 725-737.
51. Tukey, H.B. 1969. Implications of Allelopathy in Agricultural Plant Science. *The Bot. Rev.* 35: 1-16.
52. Uribe, S., Alvarez, R. y Peña, A. 1984. Effects of  $\beta$ -pinene, a Nonsubstituted Monoterpene, on Rat Liver Mitochondria. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 43-50.
53. Van Sumere, C.F., Cotterie, J., De Grey, J. y Kint, J. 1971. Biochemical Studies in Relation to the Possible Germination Regulatory Role of Naturally Occurring Coumarin and Phenolics. *Recent Adv. Phytochem.* 4: 165-221.
54. Whittaker, R.H. y Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: Chemical Interactions Between Species. *Science* 171 (3973): 757-770.