



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TES01000188284

"EFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA DE *Ipomoea tricolor* SOBRE
LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE
RADICULA DE *Echinochloa crusgalli*"

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

Presenta

MONICA RAQUEL CALERA MEDINA

México, D.F. Noviembre de 1992.

JURADO:

Presidente	Dr. Blas Lotina Henksen
1er. Vocal	Dr. Jorge Sarquis R.
Secretario	Dra. Rachel Mata Essayag
1er Suplente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
2do. Suplente	Dra. Ana Luisa Anaya Lang

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. Marina Gavilanes Ruiz del Departamento de Bioquímica de la División de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Química, UNAM y en el Laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya Lang del Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Sustentante:

Mónica Raquel Calera Medina

Asesor:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Durante el período de estudios de Maestría se recibió una beca nacional de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, así como un complemento de beca otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), no. de registro 57811, sin los cuales la presente investigación no hubiera sido posible.

De manera muy especial para la Dra. Ana Luisa Anaya Lang por brindarme su orientación, apoyo, amistad y confianza durante la realización de este trabajo.

Agradezco profundamente a la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por haber dirigido esta tesis, así como por sus enseñanzas y el interés mostrado en mi superación académica y personal.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por ofrecerme su continuo apoyo, sabiduría y amistad.

Con gran respeto y amor a mis padres:

Guadalupe Medina Rivera

Juan Antonio Calera Vitela

A mis queridas hermanas:

Marcia A. Calera Medina

Sara G. Calera Medina

A mi maravilloso cuñado:

Ricardo F. Ramírez Patiño

A mis adorables sobrinos:

Mariana A. Ramírez Calera

Montserrat Ramírez Calera

Antonio C. Calera

Itzel J. Ramírez Calera

Con mucho amor a mi amigo, compañero y esposo:

Roberto Sánchez Olea

A toda mi gran familia:

A mis tios, a mis primos, a mis demás sobrinos, a mis suegros, cuñados y también a los que ya no están presentes.

Con respeto y agradecimiento a la memoria del:

Ing. Othón Canales Valverde

A mis compañeros y amigos del laboratorio 206, Instituto de Fisiología Celular (Blanca, Helvia, Edda, Caamal, Oscar, Andrea, Verónica) y del laboratorio 113, Facultad de Química (Sobeida, Oscar, Fernando, Alicia, Carmen).

A mis amigos (Yvette, Luis Héctor, Perla, Gisela, Patricia, Fernando).

A mis amigos de la infancia

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	
METABOLITOS SECUNDARIOS.....	2
CONCEPTO DE ALELOPATIA.....	4
MECANISMOS DE ACCION.....	6
MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	8
ATPasas.....	9
ATPasa DE H ⁺ DE MITOCONDRIA.....	11
ATPasa DE H ⁺ DE TONOPLASTO.....	12
ATPasa DE H ⁺ DE MEMBRANA PLASMÁTICA.....	14
PRINCIPALES FACTORES REGULADORES DE LA ACTIVIDAD DE LA	
ATPasa DE H ⁺ DE MEMBRANA PLASMÁTICA:	
A) AUXINAS.....	18
B) FUSICOCINA.....	20
C) MODIFICACION DE PROTEINAS (FOSFORILACION).....	21
D) CONDICIONES DE LUZ.....	22
ANTECEDENTES DE EFECTOS DE COMPUESTOS SECUNDARIOS SOBRE LA	
ATPasa DE H ⁺ DE MEMBRANA PLASMÁTICA.....	23
COMPUESTO ALELOPÁTICO: RESINA GLICOSIDICA.....	24
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	28
HIPOTESIS.....	29
MATERIALES Y METODOS	
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	30

2. OBTENCION DE LA FRACCION MICROSOMAL.....	31
3. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA POR UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.....	33
4. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA POR PARTICION EN UN SISTEMA DE POLIMEROS EN DOS FASES.....	33
5. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	37
6. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	37
RESULTADOS.....	39
DISCUSION.....	73
CONCLUSIONES.....	86
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	88

LISTA DE ESQUEMAS

- ESQUEMA 1. OBTENCION DE LA FRACCION MICROSOMAL DE LAS RADICULAS
DE *Echinochloa crusgalli*.....32
- ESQUEMA 2. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA POR
UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.....35
- ESQUEMA 3. OBTENCION DE VESICULAS PURIFICADAS POR EL METODO DE
PARTICION EN DOS SISTEMAS DE FASE (DEXTRAN T-500/PEG
3350).....36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. POSIBLES ACCIONES DE LA ATPasa DE H ⁺ DE LA MEMBRANA PLASMATICA SOBRE LA FISIOLOGIA CELULAR.....	15
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA RESINA GLICOSIDICA.....	26
FIGURA 3A. EFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA (10 µg/ml) SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR DE <i>Echinochloa crusgalli</i>	40
FIGURA 3B. PESO FRESCO DE LAS RADICULAS DE <i>Echinochloa crusgalli</i> A 2, 3 y 4 DIAS DE CRECIMIENTO.....	41
FIGURA 4. CURSO TEMPORAL DE LA HIDROLISIS DE ATP EN LA FRACCION MICROSOMAL.....	42
FIGURA 5. ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa EN LA FRACCION MICROSOMAL EN TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO A -70 °C.....	43
FIGURA 6. EFECTO DEL VANADATO SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION MICROSOMAL.....	46
FIGURA 7. SENSIBILIDAD DE LA HIDROLISIS DE ATP AL CLORURO DE METILENO Y DIMETILFORMAMIDA EN LA FRACCION MICROSOMAL A TRES CONCENTRACIONES DIFERENTES DE LOS DISOLVENTES.	47
FIGURA 8. EFECTO DE LA RESINA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP EN LA FRACCION MICROSOMAL.....	49
FIGURA 9. EFECTO DEL DIMETILSULFOXIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ATPasa EN LA FRACCION MICROSOMAL.....	50
FIGURA 10. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE PREINCUBACION CON LA RESINA.....	51
FIGURA 11A. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP EN LAS VESICULAS DE LA FRACCION DE MEMBRANA PLASMATICA (U ₃), DE RADICULA	

	DE <i>E. crusgalli</i>	69
FIGURA 11B.	INHIBICION DE LA RESINA GLICOSIDICA (20 a 200 μ g) SOBRE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP EN LAS VESICULAS DE LA FRACCION U ₃ (MEMBRANA PLASMATICA) DE RADICULA DE <i>E. crusgalli</i>	70
FIGURA 12A.	EFECTO DEL COMPUESTO TRICOLORINA A (130 a 1305 μ M) SOBRE LA ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION U ₃ (VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA)....	71
FIGURA 12B.	INHIBICION DEL COMPUESTO TRICOLORINA A (130 a 1305 μ M) SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION U ₃ (VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA)....	72
FIGURA 13.	MODELO DE ACCION DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H ⁺ DE MEMBRANA PLASMATICA.....	84

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MECANISMOS DE ACCION DE COMPUESTOS ALELOPATICOS SOBRE DIVERSOS PROCESOS CELULARES.....	7
TABLA 2. INHIBIDORES ESPECIFICOS EMPLEADOS PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DE ATPasa EN LA FRACCION MICROSOMAL O EN LAS VESICULAS PURIFICADAS DE MEMBRANA PLASMATICA.....	38
TABLA 3. ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP POR LA FRACCION MICROSOMAL DE RADICULA DE <i>Echinochloa crusgalli</i>	45
TABLA 4. EFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION MICROSOMAL EN PRESENCIA DE INHIBIDORES ESPECIFICOS.....	53
TABLA 5. EFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION MICROSOMAL EN PRESENCIA DE MEZCLAS DE INHIBIDORES ESPECIFICOS.....	55
TABLA 6. SENSIBILIDAD DE LA HIDROLISIS DE ATP A INHIBIDORES ESPECIFICOS POR LAS VESICULAS PURIFICADAS EN GRADIENTES DE SACAROSA.....	58
TABLA 7. HIDROLISIS DE ATP DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA PURIFICADAS POR PARTICION DE FASES EN DOS POLIMEROS..	60
TABLA 8. EFECTO DE LA RELACION DE POLIMEROS SOBRE LAS VESICULAS (U_2) OBTENIDAS POR EL METODO DE PARTICION DE FASES.....	62
TABLA 9. ENRIQUECIMIENTO DE LAS VESICULAS U_2 POR UNA SEGUNDA PARTICION DE FASES.....	64
TABLA 10. EFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA	

PURIFICADAS POR UNA DOBLE PARTICION DE FASES.....66

TABLA 11. EFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS
DE ATP DE LA FRACCION U₃ (M.P.) EN PRESENCIA DE
INHIBIDORES ESPECIFICOS.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP : Adenosintrifosfato
- BSA : Albúmina de suero bovino
- CCCP : Carbonil cianuro 3-cloro fenilhidrazona
- CTC : Carbonato-tartrato-cobre
- DES: Dietilestilbestrol
- DMF : Dimetilformamida
- DMSO : Dimetilsulfóxido
- DOC : Desoxicolato de sodio
- DTT : Ditiotreitól
- EDTA : Etilendiamino tetraacético
- KSCN: Tiocianato de potasio
- PEG : Polietilenglicol
- Pi : Fosfato inorgánico
- SDS : Dodecil sulfato de sodio
- TLCK : L-1-cloro-3-4-tosilamido-7-amino-2-heptanona
- TPCK : L-1-cloro-3-4-tosilamido-4-2-heptanona

RESUMEN

Los compuestos alelopáticos pueden afectar una gran variedad de procesos celulares en la planta receptora. Los mecanismos de acción pueden ser diversos, alterando procesos como división celular, síntesis de proteínas, respiración, actividad enzimática, etc. La resina glicosídica (compuesto alelopático) aislada de *Ipomoea tricolor* Cav. presentó un efecto inhibitorio del 86% sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* a 10 ug/ml.

La ATPasa de H^+ de membrana plasmática genera un gradiente de protones, que es la fuente de energía para diversos sistemas de transporte (aminoácidos, azúcares y otros iones). Igualmente, contribuye al establecimiento del pH intra y extracelular, que es importante para el desarrollo de funciones tales como la elongación y diferenciación celular. Con base en lo anterior, se determinó el efecto de la resina glicosídica sobre la ATPasa de H^+ como un posible mecanismo alelopático. Las vesículas de membrana plasmática se purificaron de las radículas de *E. crusgalli* por el método de partición en polímeros en dos fases y se cuantificó su acción hidrolítica de ATP. La contribución de la actividad de ATPasa de membrana plasmática fue del 87% (sensible a vanadato) y la de la ATPasa mitocondrial y fosfatasa ácida fue del 10% (susceptible a inhibición por azida y molibdato), no se detectó contribución alguna de la ATPasa de tonoplasto (sensible a nitrato). La resina glicosídica (261 μM) presentó una inhibición del 30% sobre la hidrólisis de ATP en las vesículas purificadas de membrana plasmática (la concentración fue calculada con base en el peso molecular del compuesto principal de la resina, la tricolorina A). Una de las conclusiones del presente trabajo es que la ATPasa de H^+ de membrana plasmática puede ser un blanco de acción de la resina glicosídica. Sin embargo, es probable que no sea el único mecanismo de acción a través del cual la resina ejerce su efecto sobre el crecimiento radicular.

INTRODUCCION

METABOLITOS SECUNDARIOS.

Las plantas producen una gran diversidad de compuestos químicos, dentro de éstos se encuentran los denominados metabolitos secundarios que no intervienen en el metabolismo básico de la célula, como lo hacen los compuestos primarios (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). Estos compuestos secundarios se derivan de un grupo de precursores sorprendentemente reducido, entre los que se encuentra el ácido acético y algunos aminoácidos esenciales (fenilalanina, tirosina y triptófano), por lo que se piensa que tienen un origen biosintético similar. Las sustancias secundarias pueden clasificarse principalmente en: fenilpropanoides, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides (Mann, 1987).

Los metabolitos secundarios se presentan esporádica e irregularmente en algunas plantas ó familias de plantas y muchos de ellos son el origen de distintas relaciones de tipo químico entre las plantas y otros organismos.

Desde un punto de vista funcional y adaptativo los compuestos secundarios que determinan el establecimiento de una relación entre dos organismos se clasifican en:

- 1) Compuestos que intervienen en las relaciones entre organismos de la misma especie. Se dividen en: a) autotoxinas, son tóxicos para la misma especie; b) autoinhibidores, que controlan el número de individuos de

la población y c) feromonas, que permiten la comunicación por medio de señales químicas entre los organismos de una misma especie: conducta reproductora, defensa, etc.

2) Compuestos que determinan la relación entre dos organismos de diferente especie, que se denominan aleloquímicos. Existen tres tipos: a) alomonas, que dan ventaja al organismo que las produce (antibióticos, algunos alelopáticos y sustancias ectócrinas del plancton); b) kairomonas, que dan ventajas al organismo que las recibe y c) depresores, que perjudican al organismo que las recibe, sin dar ventajas al que las produce (Whittaker y Fenny, 1971; Anaya, 1981).

La función que desempeñan los metabolitos secundarios aún no está completamente esclarecida; sin embargo, se ha propuesto que cumplen funciones de protección para los organismos que los sintetizan, confiriendo resistencia al ataque de herbívoros, depredadores y microorganismos patógenos ó como instrumentos de comunicación entre los diversos organismos (Seigler y Price, 1976; Swain, 1977). Estos compuestos secundarios pueden desempeñar más de una función como agentes de comunicación química, lo cual puede determinar una significación ecológica muy grande.

CONCEPTO DE ALELOPATIA.

Las interacciones planta/planta pueden ser atribuídas a factores físicos y ambientales. Sin embargo, existen otros tipos de interacciones que involucran productos químicos. Estas últimas se refieren al fenómeno denominado alelopatía. Este término fue definido por Rice (1979), como cualquier efecto benéfico ó perjudicial de una planta sobre otra, incluyendo microorganismos, por medio de la producción y liberación de compuestos químicos al ambiente.

Los compuestos químicos involucrados en la alelopatía se conocen como alelopáticos. Se clasifican dentro de quince categorías: ácidos fenólicos, quinonas, terpenos, esteroides, cumarinas, ácidos grasos de cadena larga, flavonoides, taninos, alcaloides, lactonas insaturadas, aminoácidos, glucósidos, purinas, ácidos orgánicos y derivados del ácido cinámico (Rice, 1984).

En la mayoría de las plantas, las hojas y la raíz son la fuente principal de compuestos alelopáticos. En algunos casos, estos compuestos secundarios pueden ser tóxicos para la planta que los produce. En las plantas han evolucionado diversas estrategias para mantener estos compuestos alelopáticos alejados de las zonas donde se efectúan reacciones de importancia metabólica: son almacenados dentro de vacuolas (separados del resto del protoplasma); son depositados en células muertas (en el duramen de la madera), en espacios intercelulares, en los pelos glandulares de la superficie de muchas plantas, son inactivados por modificación, tornándose inocuos, ó son secretados al exterior (Anaya, 1981).

La liberación de los compuestos alelopáticos al ambiente puede ocurrir por:

- a) Volatilización a través de las hojas.
- b) Lixiviación (lavado) de las partes aéreas de la planta por la lluvia, la niebla y el rocío.
- c) Exudación a través de las raíces.
- d) Liberación de los compuestos de los restos orgánicos (hojarasca) por medio de lixiviación ó por la descomposición microbiana del mismo (Tukey, 1969).

La cantidad y la calidad de sustancias tóxicas que se acumulan en una planta depende en gran parte de las particularidades de su crecimiento, del suelo, del clima, de la altitud, de la temporada, etc (Mandava, 1985).

Los compuestos alelopáticos de la planta donadora pueden interferir en los procesos metabólicos primarios de la planta receptora. La actividad biológica de estos compuestos va a depender de su naturaleza química, de su concentración, de la sensibilidad de la planta receptora, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales (Einhellig, 1986). En muchos de los estudios de alelopatía realizados directamente con este tipo de compuestos químicos, se ha comprobado que algunos de ellos inhiben el crecimiento de diversas especies a ciertas concentraciones y estimulan el crecimiento de las mismas u otras especies a concentraciones menores. Es muy probable que en la mayor parte de los casos en que se produce un efecto alelopático de una planta sobre otro organismo, se encuentre implicada no una sola sustancia,

sino una mezcla de ellas (Putnam y Tang, 1986).

Se ha propuesto que la alelopatía puede llegar a ser un arma muy efectiva en el combate de malezas, considerando que existen propiedades alelopáticas en los tipos silvestres de algunas especies cultivadas y que estas propiedades pueden transferirse genéticamente por medio de cruzamientos ó bien por ingeniería genética. Al incrementarse el uso de plantas cultivadas con propiedades alelopáticas, se evitarían la contaminación del ambiente y el gasto económico, derivados del uso de herbicidas para controlar las malas hierbas (Putnam, 1985).

MECANISMOS DE ACCION.

Los alelopáticos pueden provocar diversos efectos sobre las plantas receptoras, los cuales pueden manifestarse como: reducción en la germinación, inhibición del desarrollo y/o vigor, retraso ó ausencia en la floración y/o fructificación y principalmente una inhibición del crecimiento radicular y/o del tallo. Todas estas manifestaciones necesariamente van acompañadas de alteraciones en el metabolismo celular (Leather y Einhellig, 1988).

Es difícil entender el mecanismo de acción de los compuestos alelopáticos debido a las complicaciones que existen en separar los efectos secundarios de los primarios y a la incertidumbre de estudiarlos en sistemas aislados (Mandava, 1985). Sin embargo, existen algunos trabajos acerca de los mecanismos por medio de los

cuales los diferentes alelopáticos actúan y que muestran que estos compuestos pueden afectar a un gran número de procesos metabólicos en diversos sitios dentro de una célula vegetal (Tabla 1).

Tabla 1.

Mecanismos de acción de compuestos alelopáticos sobre diversos procesos celulares.

NIVEL DE ACCION	COMPUESTO	REFERENCIA
Actividad Enzimática	Ac. fenólicos	Jain y Srivastava (1981) Sato et al. (1982)
Captura de Nutrientes	Ac. fenólicos Flavonoides	Einhellig (1986) Balke (1985) Wacker et al. (1990)
División Celular	Terpenoides volátiles Cumarinas	Jankay y Muller (1976) Alam et al. (1987)
Fotosíntesis	Derivados Ac. cinámico y Ac. benzoico Cumarinas	Einhellig y Rasmussen (1979)
Permeabilidad Membranal	Ac. fenólicos	Harper y Balke (1981)
Respiración	Quinonas	Koeppe (1972)
Síntesis de clorofila	Derivados Ac. cinámico y Ac. benzoico	Einhellig y Rasmussen (1979)
Síntesis de proteínas	Cumarinas	Cameron y Julian (1980)

MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

Todas las propiedades de las células vegetales dependen en algún grado de las cualidades de sus membranas. En una célula vegetal las membranas biológicas realizan principalmente dos papeles: el primero es estructural porque delimitan los organelos y el segundo es funcional porque permiten el movimiento selectivo de diversas sustancias desde un compartimento al otro.

La estructura de las membrana es establecida de acuerdo con el Modelo del Mosaico Fluido propuesto por Singer y Nicolson (1972). En este modelo, los fosfolípidos se encuentran en la forma de una bicapa discontinua con las cabezas polares en contacto con el agua y las proteínas unidas a la parte cargada de la bicapa lipídica (principalmente por interacciones electrostáticas) ó intercaladas en su interior. Tanto lípidos como proteínas son capaces de movilidad lateral (Malhotra, 1983).

La organización funcional de las membranas biológicas, depende de la coordinación de por lo menos tres clases de proteínas de membrana: 1) bombas, que participan en el transporte activo primario durante él cual hay traducción de la energía química ó fotoquímica; 2) acarreadores, que efectúan el transporte de iones inorgánicos y solutos orgánicos, y 3) canales, que permiten el movimiento iónico rápido a velocidades difusionales altas (Maloney y Ambudkar, 1989; Sanders, 1990).

En las plantas se propone que el incremento en la permeabilidad causa la senescencia de los tejidos vegetales (marchitamiento de hojas y pétalos, y aumento en la salida de

constituyentes celulares como pigmentos vacuolares, azúcares y electrolitos). Esta pérdida en la integridad membranal se correlaciona con una disminución en el contenido de lípidos (Suttle y Kende, 1980).

La membrana plasmática es aquella que limita uno de los mayores compartimentos de la célula vegetal, el citoplasma. Esta membrana separa a la célula de su ambiente, constituyendo una barrera frente al ataque de microorganismos y la entrada de sustancias que pueden ser tóxicas para la célula. Asimismo, la presencia de una pared celular en las plantas constituye otro tipo de barrera que presentan las células vegetales. Esta se encuentra constituida principalmente por polisacáridos, celulosa y pectinas (Duffus y Duffus, 1984; Brett y Waldron, 1990).

ATPasas.

En los sistemas de transporte activo primario la energía necesaria proviene de la hidrólisis de los enlaces fosfoanhidrido de la molécula de ATP.

En los cloroplastos y mitocondrias de células vegetales y en bacterias existen procesos de transferencia de electrones denominados reacciones redox ó reacciones de oxidación-reducción, las cuales se encuentran acopladas a la formación de ATP (Harold, 1986).

De acuerdo con la Teoría Quimiosmótica, propuesta por Mitchell

(1961), se establece un acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP, lo que sugiere que el flujo de electrones a través del sistema de moléculas acarreadoras conduce protones a través de las membranas, generando un gradiente electroquímico de protones, que es utilizado en la síntesis de ATP (Hinkle y McCarty, 1988).

Las enzimas que participan en la síntesis y/o hidrólisis de ATP se localizan a nivel de membrana, son denominadas ATPasas. Estas se dividen en: ATP sintetasas y ATP hidrolasas.

Las ATP sintetasas catalizan la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi utilizando la energía generada del gradiente proto-motriz formado por el transporte de electrones durante los procesos de fosforilación oxidativa (mitocondrias y bacterias) y fosforilación fotosintética (cloroplastos y bacterias fotosintéticas) (De Meis, 1989).

Las ATP hidrolasas realizan la hidrólisis de ATP para originar ADP y ortofosfato, generando una expulsión electrogénica de protones y otros iones. El gradiente electroquímico formado provee la energía necesaria para el transporte de azúcares, aminoácidos y otros iones (Harold, 1986).

Las ATPasas se han caracterizado con mayor amplitud en animales que en plantas. Su localización en organelos celulares vegetales es diversa (mitocondrias, cloroplastos, lisosomas, vacuola, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y en la membrana plasmática).

ATPasa DE H⁺ DE MITOCONDRIA.

La ATPasa mitocondrial está muy bien caracterizada. La función que presenta es la de sintetizar ATP es decir, es una ATP sintetasa.

Esta enzima es denominada ATPasa-F₀F₁, porque se encuentra constituida por dos partes: el componente F₀, hidrofóbico, que corresponde al canal iónico y el componente F₁, hidrofílico, con los sitios de unión de los nucleótidos y de catálisis (Hashimoto et al., 1990).

En bacterias, la enzima se encuentra constituida por ocho diferentes subunidades presentando una estequiometría de $\alpha_3 \beta_3 \gamma$ ϵ a $b_2 c_{10}$. La ATPasa-F₀F₁ en mitocondria presenta una estructura similar a la bacteriana, pero además contiene otras subunidades: la subunidad OSCP (proteína que confiere sensibilidad a oligomicina), la proteína F₆ y la proteína F_B. Las proteínas OSCP y F₆ son requeridas para la interacción del componente F₁ con el componente F₀. La proteína F_B (subunidad de F₀), es necesaria para las reacciones de acoplamiento de energía de la ATPasa-F₀F₁. La enzima presenta un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (Hashimoto et al., 1990). La actividad de la enzima es inhibida por: oligomicina (1 μ M), DCCD (diciclohexilcarbodiimida a 1 μ M), y azida (1 mM) (Bowman y Bowman, 1986).

La ATPasa de H⁺ mitocondrial ha sido obtenida del endospermo de la alcachofa (*Helianthus tuberosus* L.) y de los cotiledones de chícharo (*Pisum sativum*) (Yoshida y Takeuchi, 1970; Horak y Packer, 1985). Métodos de purificación como gradientes de sacarosa y

centrifugación diferencial se han utilizado con éste propósito (Horak et al., 1989; Taiz y Taiz, 1991).

ATPasa DE H⁺ DE TONOPLASTO.

La vacuola es un compartimento celular que tiene un papel fundamental en el mantenimiento y regulación del turgor celular y en el transporte y almacenamiento de diversos iones, aminoácidos y metabolitos secundarios. El tonoplasto ó membrana vacuolar está formada por una sola membrana constituida por fosfolípidos y colesterol. Las vacuolas comprenden el 20-30% del volumen total de las levaduras y el 80-90% de las algas. Contiene proteasas, nucleasas, glicosidasas y enzimas hidrolíticos como la ATPasa de H⁺ y la pirofosfatasa (Anraku et al., 1989).

La ATPasa de H⁺ de vacuola ó tonoplasto en eucariontes está presente en las membranas de una amplia variedad de compartimentos acídicos intracelulares incluyendo vacuolas de plantas y hongos, lisosomas, vesículas de Golgi y granulos cromafines en animales (Forgac, 1989). Esta enzima provee la fuerza proto-motriz necesaria para el transporte activo de aminoácidos básicos, iones Ca⁺² y varios aniones (Cl⁻) a través del tonoplasto.

La ATPasa de H⁺ de tonoplasto ha sido clasificada como ATPasa tipo "V" (vacuolar). Se ha purificado parcialmente de plantas superiores (tubérculo de la remolacha; radículas y coleoptilos de maíz, avena, hipocótilos de soya, garbanzo, células de Acer

pseudoplatanus) y hongos (Bennet et al., 1984; Mandala y Taiz, 1985; Kasamo et al., 1991). Los métodos empleados han sido centrifugación diferencial, centrifugación en gradientes de dextran, sacarosa, glicerol y/o ficol (Kaestner et al., 1988; Canut et al., 1990, Brauer y Tu, 1991; Pugin et al., 1991).

La masa molecular obtenida por cromatografía de filtración en gel es de 400-500 kDa; presenta tres tipos diferentes de subunidades denominadas a, b y c, con masas moleculares de aproximadamente 70, 60 y 16 kDa, respectivamente. La subunidad a es el sitio catalítico del complejo enzimático. El polipéptido más pequeño, subunidad c, es el componente al cual se une el DCCD y funciona como un canal protónico. La subunidad b está presente en una cantidad equimolar con la subunidad a, pero aún no se conoce su función (Anraku et al., 1989; Taiz y Taiz, 1991). En levaduras la enzima se encuentra constituida por siete diferentes subunidades, las dos más pequeñas están integradas a la membrana y las otras cinco forman el complejo catalítico hidrofílico (Matsuura-Endo et al., 1990).

El análisis de secuenciación de la subunidad a y de la subunidad b ha establecido en parte su relación con las subunidades β y α , respectivamente, de las F_0F_1 -ATPasas de mitocondria y cloroplasto. Además el proteolípido de 16 kDa está relacionado con el componente F_0 (Kane et al., 1989; Nelson y Taiz, 1989). La ATPasa vacuolar, en *Neurospora crassa*, contiene un complejo proteico periférico del tipo F_1 , como en la ATPasa mitocondrial, aunque la función que presenta es diferente: la primera en

hidrólisis y la segunda en síntesis (Bowman et al., 1989; Taiz y Taiz, 1990).

La ATPasa de tonoplasto es resistente a ortovanadato, azida y oligomicina, pero es inhibida por nitrato (20 mM), N-etilmaleimida (10 μ M), DCCD (10 μ M) y presenta estimulación por los iones Cl^- (Kaestner et al., 1988).

La fosfatasa ácida presenta una amplia localización en diversos organismos; en plantas se encuentra en la vacuola. Esta enzima tiene un peso molecular de 53 kDa obtenido por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 8%. Se ha aislado de los cotiledones de soya (*Glycine max*), de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de semillas de girasol (*Helianthus annuus*) (Ullah y Gibson, 1988).

El molibdato (0.1 mM) es un inhibidor de la actividad de la fosfatasa; los esteres de fosfato constituyen su sustrato.

ATPasa DE H^+ DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

La ATPasa de H^+ de membrana plasmática se encuentra involucrada en funciones cruciales para la célula vegetal como son el mantenimiento de la fuerza protón motriz (para el transporte de iones, azúcares y aminoácidos) y la regulación del pH intra y extracelular (Figura 1) (Serrano, 1989).

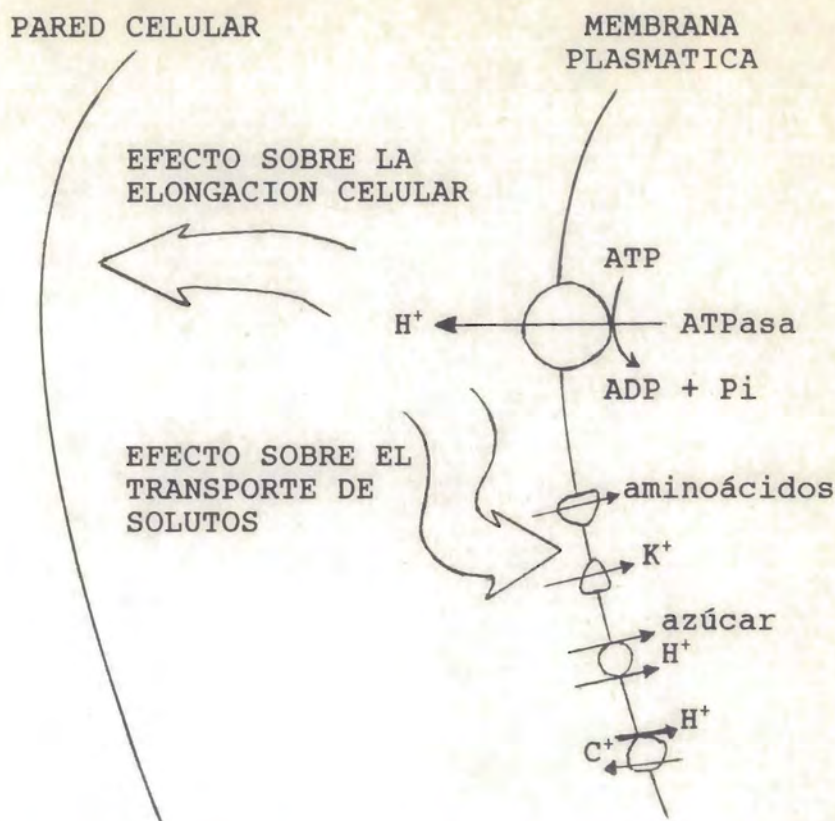


Figura 1. Posibles acciones de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática sobre la fisiología celular.

Esta enzima es denominada tipo E_1-E_2 porque presenta dos distintas conformaciones designadas como E_1 y E_2 durante el ciclo catalítico. Esta ATPasa forma un intermediario aspartilfosfato durante su catálisis (Vara y Serrano, 1983). Existe como un sólo polipéptido de peso molecular de 100 kDa, subunidad catalítica (Smith y Scarborough, 1984; Serrano, 1988). Su sustrato es el complejo $ATP-Mg^{2+}$, mostrando una alta especificidad por el ATP. La actividad con otros nucleótidos trifosfato, ADP ó monoesteres fosfato es menos del 5 al 10% comparados con el ATP (Serrano, 1990).

La estructura que presenta la enzima se caracteriza por tener

mayores regiones hidrofílicas hacia el lado citoplásmico de la membrana y una pequeña porción de la cadena polipeptídica expuesta en el lado externo. Asimismo, algunos autores han postulado que la enzima presenta siete dominios transmembranales como en *Neurospora*, ocho como en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* ó en algunos casos hasta diez dominios (Serrano, 1988; Nelson y Taiz, 1989). La región 3 contiene el intermediario fosforilado y se localiza en la apertura citoplásmica del canal (posición ideal al acoplamiento de transporte de iones e hidrólisis de ATP). Las regiones 4-7 constituyen un dominio de cinasa, involucradas en la unión de ATP y la formación del intermediario fosforilado. La región 2 es parte de un dominio separado de fosfatasa, la cual cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado. En *Saccharomyces cerevisiae* el dominio N-terminal es requerido para la inserción funcional de la enzima dentro de la membrana plasmática y su dominio C-terminal está involucrado en la regulación de la enzima por glucosa (Portillo et al., 1989; Serrano, 1990).

La purificación de la ATPasa de membrana plasmática se ha realizado por centrifugación diferencial, por centrifugación en gradientes de sacarosa, por gradientes de dextrán y partición de fases en dos polímeros (Dupont et al., 1982; Mandala et al., 1982; Larson et al., 1987; Kasamo, 1988). Se ha aislado de coleóptilos de avena; radículas de trigo, maíz, tomate, y avena; de hipocótilos de garbanzo; del tubérculo de la remolacha, y de levaduras (Briskin y Reynolds-Niesman, 1989; Ewing et al., 1990; Palmgren, 1990; Wach et al., 1990; Hsu et al., 1991; Kasamo y Yamanishi, 1991).

Durante la purificación y reconstitución de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en liposomas, la enzima ha mostrado requerir fosfolípidos específicos para su activación, como fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol (Serrano et al., 1988; Brauer y Tu, 1989).

La actividad de la ATPasa es inhibida por vanadato (50 µM), el cual se une al sitio catalítico de la enzima; por dietilestilbestrol (50 µM) y en menor grado por DCCD (0.1 mM); es estimulada por la presencia de K⁺ (Serrano, 1990).

La ATPasa de H⁺ de membrana plasmática ha sido considerada de gran importancia en la acidificación del medio extracelular y elongación de la pared celular. En relación a estos procesos, la teoría del crecimiento ácido postula que existe un efecto de la auxina (ácido 3-indolacético) ó de la toxina fusicocina proveniente del *Fusicoccum amygdali* sobre la ATPasa de membrana plasmática, que provoca un aumento en la actividad de la enzima (extrusión de protones), lo cual permite la elongación de la pared celular por un incremento en la plasticidad de la pared vía una activación de las hidrolasas de polisacáridos, lo cual resulta en la expansión de la célula impulsada por el turgor (Hager, 1984; Brett y Waldron, 1990). Estudios realizados con ácido 3-indolacético (IAA) a una concentración de 1 µM sobre vesículas de membrana de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) han puesto de manifiesto tales efectos (Santoni et al., 1990).

Un cúmulo de evidencias indica que la actividad de la enzima es modulada por importantes factores reguladores como

fitorreguladores, toxinas producidas por patógenos, modificación de proteínas (incluyendo la fosforilación por cinasas), y condiciones de luz y estres (Serrano, 1990).

PRINCIPALES FACTORES REGULADORES DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H⁺ DE MEMBRANA PLASMÁTICA:

A) AUXINAS.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas ó sustancias reguladoras que influyen sobre una gama muy amplia de respuestas de crecimiento y desarrollo en plantas, como la elongación, división y diferenciación celular. El ácido 3-indolacético (IAA), es una sustancia que pertenece a este grupo. Se sintetiza de manera característica en el ápice del tallo (meristemo terminal ó cerca de éste) y en tejidos jóvenes (Feldwisch et al., 1992).

El aislamiento del IAA se efectúa por cromatografía en capa fina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de inmunoafinidad, sistemas de HPLC, etc. La detección del IAA se realiza a través de la medida de la absorbancia a 280 nm, por medio de la cuantificación de derivados oxidados, monitoreados con detectores electroquímicos, o midiendo la fluorescencia ya sea directamente del grupo indol (excitando a 280 nm y registrando a 350 nm) o del producto entre el IAA y el anhídrido acético (el 2-metilindol- α -pirona (excitando a 440 nm y registrando la

fluorescencia a 490 nm) (Sandberg et al., 1987).

El IAA induce la acidificación del apoplasto en tejidos sensibles a auxinas, lo cual brinda apoyo a la teoría del crecimiento ácido. Su efecto no excede de 0.6 unidades de pH. La acción que presenta sobre la extrusión de protones es transitoria y sensible a cicloheximida. Este efecto se evidenció en vesículas de membrana de chícharo (*Pisum sativum* L. var. Alaska) avena (*Avena sativa*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Gabathuller y Cleland, 1985; Senn, et al., 1988; Altabella et al., 1990).

Se ha propuesto que existen proteínas receptoras que unen auxinas (ABPs). Estas se encontraron en fracciones membranales de coleóptilos de maíz de membrana plasmática, de retículo endoplásmico y de tonoplasto. A nivel de membrana plasmática existen por lo menos tres ABPs: 1) un acarreador que captura auxinas; 2) un acarreador que libera auxinas, y 3) un receptor que influye sobre la elongación (Feldwisch et al., 1992).

La actividad de las auxinas sobre el bombeo de protones por la ATPasa depende principalmente de dos factores: la concentración de la hormona y el estado fisiológico de las plantas utilizadas para el aislamiento de membranas (Santoni et al., 1990).

El mecanismo de acción que se ha propuesto es que la auxina provoca una alteración de la actividad catalítica de la ATPasa y del transporte de protones. Aunque la ATPasa de membrana plasmática consiste de un péptido catalítico único, ésta puede requerir otros péptidos para un transporte eficiente de protones, en una forma análoga a la ATPasa- F_0F_1 . La subunidad que une la auxina no es la

subunidad catalítica, pero podría ser un péptido del canal protónico ó un péptido regulador.

B) FUSICOCINA.

La toxina denominada fusicocina es aislada del hongo *Fusicoccum amygdali*, estimula la extrusión de protones y la actividad hidrolítica de la ATPasa de membrana plasmática. La acción de esta toxina se ha reportado en vesículas de membrana plasmática de haba (*Vicia faba*), rábano (*Raphanus sativus* L.) y en el alga *Elodea densa* (Blum et al., 1988; Cocucci y Marrè, 1991). El efecto de la fusicocina sobre el bombeo de protones no es transitorio, pero es evidente solamente en un rango cercano al pH de 7.5 y la activación de la ATPasa inducida por la fusicocina se satura a bajas concentraciones de la toxina (De Michelis et al., 1989).

Se ha propuesto que existe un receptor de fusicocina a nivel de la membrana celular en vesículas de membrana plasmática de radículas de avena. Sin embargo, el mecanismo a través del cual la unión de la fusicocina al receptor activa la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática aún no se conoce (De Boer et al., 1989; De Michelis et al., 1989).

C) MODIFICACION DE PROTEINAS (FOSFORILACION).

Las ATPasas de H^+ de membrana plasmática de plantas y hongos pueden ser reguladas por proteínas cinasas. En ambos grupos de organismos, las ATPasas son fosforiladas *in vivo* en múltiples sitios. La enzima en hongos solamente contiene fosfoserina, pero en plantas existen tanto sitios de fosfoserina como de fosfotreonina. Estudios *in vitro*, han demostrado que una proteína cinasa unida a membrana puede fosforilar ambos tipos de ATPasas, y en el caso de plantas tal fosforilación es dependiente de calcio a concentraciones micromolares (Serrano, 1989).

Se ha reportado la purificación y caracterización de una proteína cinasa de las membranas de levaduras (Kolarov et al., 1988). Esta cinasa copurificó con la ATPasa de H^+ (marcador característico de la membrana plasmática) después de la centrifugación y solubilización de la fracción membranal. La caracterización de la proteína cinasa demostró que es independiente de AMPc, no es afectada por calcio, modifica residuos de serina y no de treonina, utiliza el ATP como sustrato y no el GTP, eluye a bajas concentraciones de sales en una columna de celulosa-DEAE, no presenta autofosforilación y el rango de pH que presenta es amplio. La preincubación de la ATPasa con la fosfatasa ácida produce un decremento en la actividad de la enzima. De acuerdo con Yanagita et al (1987), la molécula de ATPasa purificada se encuentra altamente fosforilada. Estos datos sugieren que la defosforilación resulta en la desactivación de la enzima.

D) CONDICIONES DE LUZ.

La inducción de la apertura estomática por luz se basa en la estimulación de las ATPasas de las células guarda, lo cual genera una captura masiva de potasio e incremento del turgor (Shimazaki y Kondo, 1987).

En la regulación de las ATPasas de H^+ por la energía luminosa han sido implicados tres diferentes clases de receptores: 1) receptor de luz roja (fitocromo), 2) receptor de luz azul, y 3) los pigmentos cloroplásticos.

La estimulación de la bomba protónica por un decremento en turgor celular parece ser un evento importante en la osmoregulación. Como en el caso de las células guarda, la captura de potasio es estimulada secundariamente, resultando en un incremento del turgor (Serrano, 1989).

ANTECEDENTES DE EFECTOS DE COMPUESTOS SECUNDARIOS SOBRE LA ATPasa DE H⁺ DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

Las reacciones de defensa en las plantas contra el ataque de depredadores, otras plantas ó microorganismos incluyen barreras físicas (espinas, pelos glandulares, etc.) y/ó químicas (fitoalexinas ó compuestos alelopáticos).

En el caso de las sustancias químicas denominadas fitoalexinas, se considera que son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular. Estas son sintetizadas y acumuladas en las plantas después de ser expuestas a la presencia de los microorganismos ó a las sustancias producidas por éstos. Existen dos tipos de compuestos formados por los microorganismos: los denominados "estimuladores", que aumentan la síntesis de las fitoalexinas y los "supresores", que inhiben la síntesis de las fitoalexinas (Luckner, 1991).

Las interacciones de plantas con parásitos pueden dar como resultado una respuesta de resistencia ó de susceptibilidad. La interfase para la interacción en la respuesta inicial involucra la membrana plasmática. Las enzimas de membrana como las ATPasas de H⁺ pueden desempeñar un importante papel en los procesos fisiológicos de las células vegetales.

Las sustancias supresoras del hongo *Mycosphaerella pinodes* inhibieron la síntesis de la pisatina, fitoalexina del chícharo (*Pisum sativum*), y la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, en una forma dependiente de la concentración de la sustancias supresoras (Yoshioka et al., 1990).

El hongo *Phytophthora infestans* produce el ácido araquidónico (sustancia "estimuladora"), que afecta la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Este compuesto inhibe la actividad de la enzima a concentraciones nanomolares en vesículas selladas de fracciones enriquecidas con membrana plasmática. Se propone que éste compuesto puede actuar directamente sobre la enzima ó bien indirectamente alterando el medio lipídico que la rodea (Ladyzhenskaya et al., 1991).

Las investigaciones con compuestos alelopáticos han mostrado que algunos flavonoles (fisetina, morina, miricetina, quercetina y rutina) inhibien la actividad de la ATPasa de H⁺ de vesículas de membrana plasmática de *Neurospora crassa* (Bowman et al., 1978).

Cruz et al. (1990), encontraron que el piquerol, compuesto aislado de *Piqueria trinervia*, producía un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática del 67% a 500 µM en la fracción microsomal de radículas de *Ipomoea purpurea*.

COMPUESTO ALELOPÁTICO: RESINA GLICOSIDICA.

La especie *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), es una arvense utilizada en los cañaverales del Estado de Morelos para el control de malezas en la agricultura tradicional. Popularmente se le conoce como titlitzin, Badoh negro, Dondiego de día ó manto. En nuestro país, las semillas son usadas como alucinógenas debido a su alto contenido de alcaloides, del tipo del ácido lisérgico (Trease

y Evans, 1982). Se han reportado especies del género *Ipomoea* que presentan resinas glicosídicas con actividad biológica: purgantes, anticancerígenas y antimicrobianas (Sarin et al., 1973; Schultes, 1982; Bieber et al., 1986).

Asímismo existen reportadas dos especies con actividad alelopática: *Ipomoea aquatica* Forrsk e *Ipomoea batatas*. Los principios activos aislados son de naturaleza terpenoide y fenólica, respectivamente (Singhvi y Sharma, 1984; Howard y Peterson, 1986, Peterson y Howard, 1991).

En la especie *Ipomoea tricolor*, la presencia de compuestos alelopáticos, principalmente la resina glicosídica y los alcaloides (tipo ergot) se evidenciaron por medio de un estudio fitoquímico biodirigido. Estos compuestos inhibieron *in vitro* el crecimiento radicular de las especies: *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli* (Calera, 1989; Anaya et al., 1990).

La resina glicosídica es una mezcla cuyos componentes poseen como aglicona el ácido jalapínico, y como función glicona un oligosacárido formado por glucosa, fucosa y ramnosa. El oligosacárido y la aglicona forman una macrolactona. Ácidos grasos de bajo peso molecular (2-metilbutírico 3-hidroxi-2-metilbutírico) se encuentran esterificando los azúcares (Figura 2). Pereda-Miranda et al. (1992), lograron purificar y caracterizar uno de los componentes de la mezcla, la Tricolorina A, la cual representa el 85% de la resina y probablemente es la responsable de la actividad alelopática.

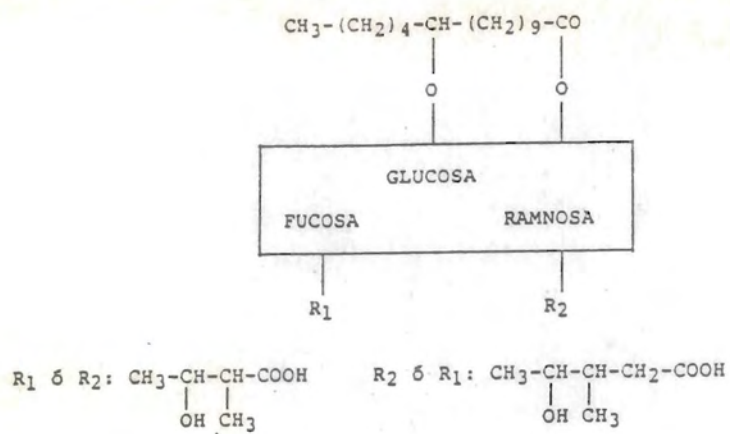


Figura 2. Elementos estructurales de los componentes de la resina glicosídica de *I. tricolor*.

OBJETIVOS

1.- OBJETIVO GENERAL.

El propósito del presente trabajo fué examinar el efecto de la resina glicosídica de *Ipomoea tricolor* sobre la actividad enzimática de las ATPasas de H^+ , entre ellas la de membrana plasmática de *Echinochloa crusgalli*, como un posible mecanismo alelopático.

Las consideraciones generales tomadas en cuenta para establecer este objetivo, fueron las siguientes:

a) El efecto inhibitorio de la resina glicosídica sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli*.

b) El papel que tienen las ATPasas de H^+ de células vegetales sobre la elongación y crecimiento celular.

c) La actividad de otros compuestos secundarios sobre la actividad de la ATPasa de membrana plasmática.

2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.0.- Establecer el efecto biológico de la resina sobre la germinación y el crecimiento de semillas de *Echinochloa crusgalli*.

2.1.- Determinar el efecto de la resina sobre la ATPasa de membrana plasmática en vesículas membranales.

2.2.- Establecer la relación de concentración de la resina con el efecto inhibitorio sobre vesículas de membrana.

2.3.- Evaluar el efecto de la resina en vesículas purificadas por gradientes de sacarosa.

2.4.- Determinar el efecto de la resina en vesículas purificadas por partición de fases.

2.5.- Identificación de las ATPasas presentes en las vesículas, como posibles blancos de acción de la resina.

HIPOTESIS:

La resina glicosídica disminuye el crecimiento de las radículas debido a su efecto inhibitorio sobre las ATPasas de membrana que intervienen en la elongación y el crecimiento celular.

MATERIALES Y METODOS

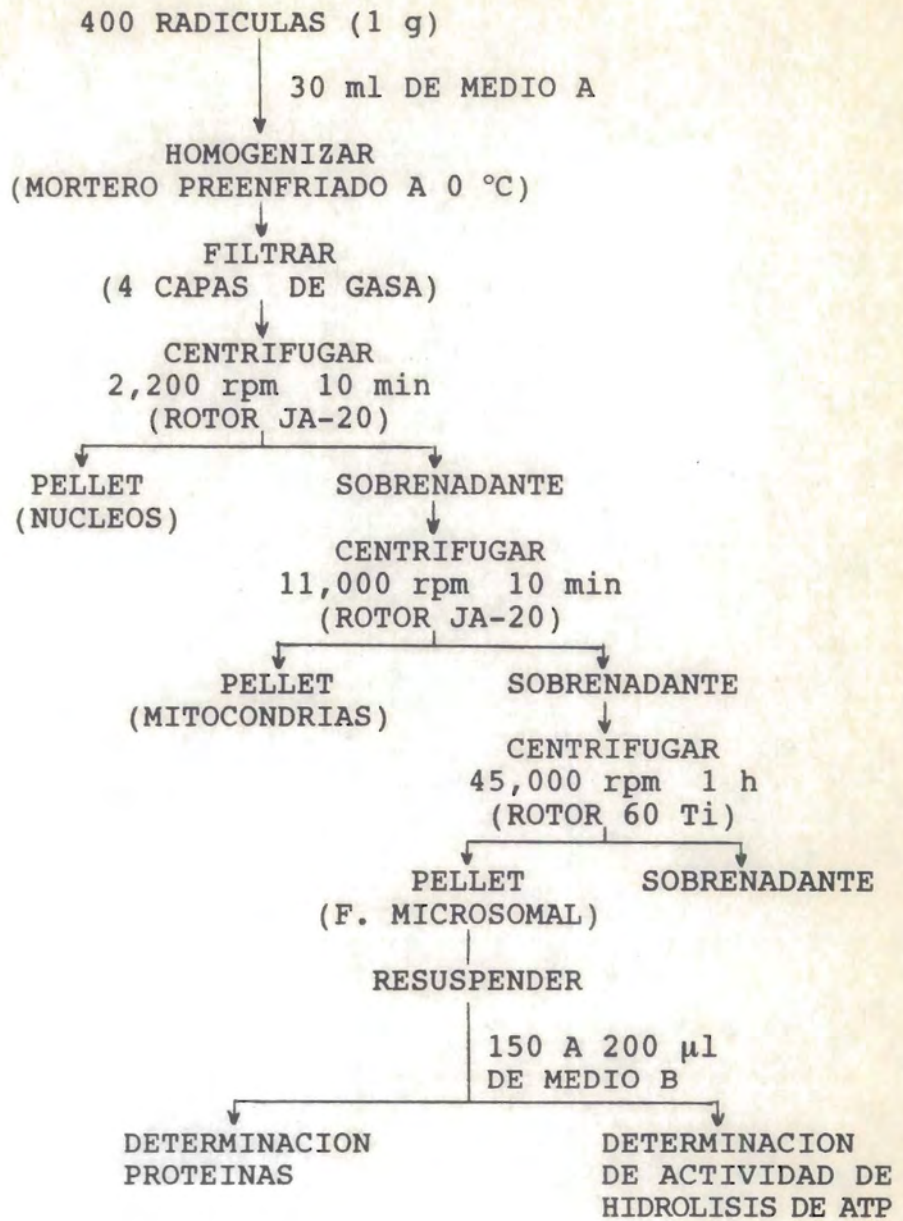
1. Material biológico.

Semillas de *Echinochloa crusgalli* se sembraron sobre papel filtro (número 42) en cajas de Petri de 6 cm de diámetro. En cada caja de Petri se adicionaron 1.5 ml de agua destilada y se se colocaron 10 semillas de la especie de prueba. Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron en una estufa a 30 °C, en la oscuridad. Después de 3 días de crecimiento las radículas se utilizaron para la obtención de la fracción microsomal.

La resina glicosídica fue aislada de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), por medio del fraccionamiento biodirigido del extracto de acetato de etilo. Las evidencias químicas y espectroscópicas permitieron proponer que los componentes de la resina son derivados del ácido 11-hidroxihexadecanoico (ac. jalapinólico) lactonizado con una unidad trisacárida, compuesta de glucosa, fucosa y ramnosa. Estos azúcares son esterificados por ácidos grasos de bajo peso molecular (Calera, 1989 y Anaya et al., 1990). El principal componente de la resina glicosídica es el compuesto tricolorina A, caracterizado y donado amablemente por el M en C. Rogelio Pereda Miranda, lo cual permitió el cálculo de concentraciones molares al utilizarse sobre la actividad de hidrólisis de ATP.

2. Obtención de la fracción microsomal.

Las radículas de *Echinochloa crusgalli* se disecaron y se homogenizaron en un mortero (preeenfriado) con medio A (Sacarosa 250 mM, Glicerol al 10%, EDTA 2 mM, ATP 1 mM, B- Mercaptoetanol, DTT 4mM, Tris/HCl 70 mM pH 8.0, Quimostatina 7 µg/ml, TLCK 10 µg/ml, TPCK 10 µg/µl), en una relación de 1 g de tejido: 15 ml de medio A. El homogenado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el residuo se homogenizó nuevamente en la misma solución. El filtrado se sometió a centrifugación diferencial (Esquema 1). El pellet recuperado en la centrifugación de 45,000 rpm constituye la fracción microsomal, la cual se resuspendió en un volúmen de 150 a 200 µl de medio B (Sacarosa 250 mM, glicerol al 10%, DTT 1mM, Tris/HCl 5mM pH 7.0, Quimostatina 7 µg/ml, TLCK 10 µg/ml, TPCK 10 µg/ml). Las muestras se almacenaron a -70 °C.



ESQUEMA 1. OBTENCION DE LA FRACCION MICROSOMAL DE LAS RADICULAS DE Echinochloa crusgalli.

3. Aislamiento de vesículas de membrana plasmática por un gradiente discontinuo de sacarosa.

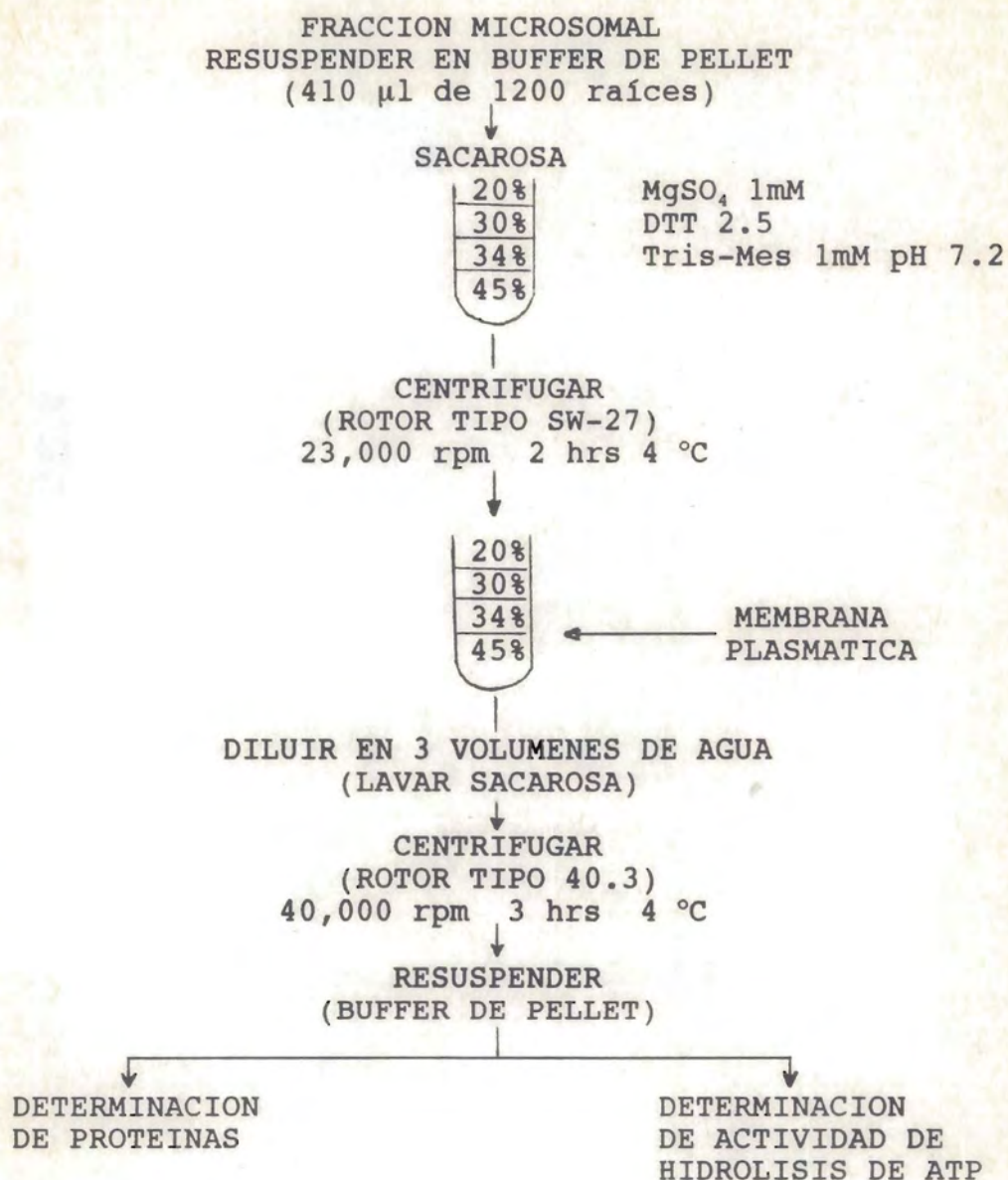
La fracción microsomal obtenida de acuerdo con el Esquema 1 (Mandala et al., 1982; Hodges y Mills, 1986), se colocó sobre un gradiente de sacarosa constituido por 20, 30, 34 y 45% (w/w) de sacarosa, $MgSO_4$ 1 mM, DTT 2.5 mM y Tris/Mes 1 mM pH 7.2. El gradiente con las membranas se centrifugó a 23,000 rpm (Rotor Tipo SW 27) por 2 hrs a 4 °C. Las vesículas de membrana plasmática se concentraron en la interfase 34/45% (Esquema 2). Las membranas fueron removidas con la ayuda de una pipeta Pasteur y se centrifugaron nuevamente con agua destilada para lavar la sacarosa. El pellet obtenido se resuspendió con medio B y se almacenó a -70 °C.

4. Aislamiento de vesículas de membrana plasmática por partición en un sistema de polímeros en dos fases.

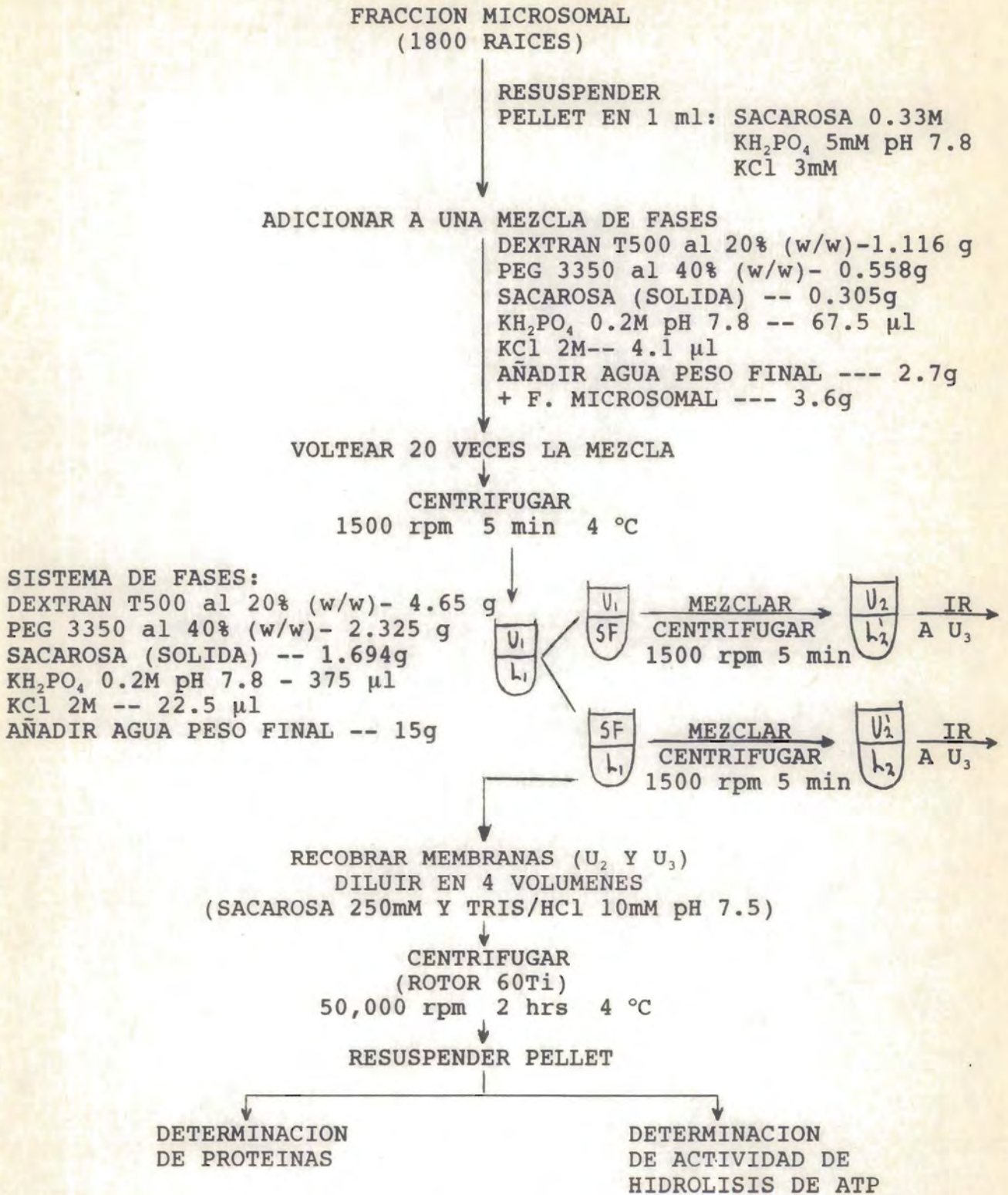
La fracción microsomal (Esquema 1) se resuspendió en 1 ml de medio constituido por: Sacarosa 330 mM, KH_2PO_4 5 mM pH 7.8 y KCl 3mM) y se adicionó a una mezcla de fases (1.26 g de Dextrán T-500 al 20% (w/w), 0.558 g de PEG 3350 al 40% (w/w), 0.305 g de Sacarosa, 67.5 μ l de KH_2PO_4 0.2 M y 6.8 μ l de KCl 2 M, agua destilada a un peso de 2.7 g y se añadió la fracción microsomal a un peso final de 3.6g). Esta mezcla se agitó invirtiendo 20 veces el tubo y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4 °C. De esta centrifugación se obtuvieron dos fases: la fase U_1 en la parte

superior (PEG) constituida por las vesículas de membrana plasmática y la fase L_1 en la parte inferior (Dextrán T-500) constituida por otras vesículas celulares (Esquema 3). Con el fin de obtener una preparación de mayor pureza, la fase U_1 se adicionó a la mezcla homogénea de un sistema de fases con la composición siguiente: 5.25 g de Dextrán T-500 al 20%, 2.625 g de PEG 3350 al 40%, 1.694 g de Sacarosa, 375 μ l de KH_2PO_4 0.2 M pH 7.8, 37.5 μ l de KCl y se añadió agua destilada a un peso final de 15 g) ¹. La preparación se centrifugó a 1500 rpm por 5 min para obtener la fase U_2 . Este último paso se repitió para la obtención de la fase U_3 . Posteriormente las membranas se diluyeron en 4 volúmenes de medio D (Sacarosa 250 mM y Tris/HCl 10 mM pH 7.5) y se centrifugaron a 50,000 rpm por 2 hrs. El pellet obtenido se resuspendió en 200 μ l de medio B y se almacenó a -70 °C (Larson et al., 1987).

¹ Lo anterior es una modificación al método de partición en un sistema de polímeros en dos fases. La fracción U_1 se adicionó a la mezcla homogénea del sistema de fases y no únicamente a la fase de dextrán de la misma como se efectúa de acuerdo con el método descrito en la literatura.



ESQUEMA 2. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA POR UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.



ESQUEMA 3. OBTENCION DE VESICULAS PURIFICADAS POR EL METODO DE PARTICION EN DOS SISTEMAS DE FASE (DEXTRAN T-500/PEG 3350).

5. Determinación de la concentración de proteína.

El método utilizado para la determinación de la concentración de proteínas fue una modificación de Lowry realizada por Peterson (1977). Este procedimiento se efectuó de la siguiente forma: a 0.9 ml de agua destilada se añadieron 5 μ l de la muestra. En cada tubo de reacción se adicionó 0.1 ml de DOC (Desoxicolato de sodio) al 0.15% y se agitó en un vórtex; posteriormente se agregó 1 ml de Reactivo A, constituido por partes iguales de agua destilada, NaOH 0.8 N, SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10% y CTC (Na_2CO_3 al 10%, CuSO_4 al 0.1% y $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ al 0.2%). Por último se adicionaron 0.5 ml de Reactivo B (una relación de un volumen de Folin Ciocalteau por 5 volúmenes de agua destilada) y se realizó una segunda agitación en un vórtex. Se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 750 nm. Se realizó una curva estándar con 10 a 60 μ g de Albúmina de Suero Bovino (BSA).

6. Determinación de actividad enzimática.

El ensayo de actividad de hidrólisis de ATP se efectuó de la siguiente forma: se adicionó 1 μ g de fracción microsomal ó de vesículas purificadas de membrana plasmática a 150 μ l de medio de reacción, constituido por Sacarosa 250 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7.0, ATP/Tris 10 mM, MgCl_2 10 mM y CCCP 7 μ M. Cuando fueron requeridos, se utilizaron algunos inhibidores específicos de las enzimas presentes en la preparación (Tabla 2).

Tabla 2.

Inhibidores específicos empleados para inhibir la actividad de ATPasa en la fracción microsomal ó en las vesículas purificadas de membrana plasmática.

CONCENTRACION	INHIBIDOR	ENZIMA INHIBIDA ESPECIFICAMENTE
100 mM	KNO ₃	ATPasa de Tonoplasto
150 ó 250 uM	Na ₃ VO ₄	ATPasa de Membrana plasmática
2 mM *	Na ₂ MoO ₄	Fosfatasa ácida
2 mM *	NaN ₃	ATPasa Mitocondrial

* Se utilizaron en mezcla.

Se permitió que la reacción procediera durante 30 min a 30 °C, transcurrido este tiempo se detuvo la reacción mediante la adición de 150 µl de SDS al 12%. La hidrólisis de ATP se midió a través de la cuantificación de Pi liberado del ATP por el Método de Chifflet modificado (González-Romo et al., 1992). Este se realizó añadiendo 300 µl del reactivo B:C (ácido ascórbico al 12% y molibdato de amonio al 2%), se incubó de 3 a 10 min a temperatura ambiente y se agregaron 450 µl de Reactivo E (citrato de sodio 2%, arsenito de sodio 2% y ácido acético 2%). Después de 20 min a temperatura ambiente se midió la absorbencia de las muestras en el espectrofotómetro a 850 nm. Se realizó una curva estándar de 10 a 60 nmoles de KH₂PO₄.

Las determinaciones de actividad en presencia de la resina glicosídica se realizaron efectuando una preincubación del compuesto con el medio de reacción (excepto ATP/Tris y MgCl₂) y las vesículas membranales durante 15 min a 30 °C. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza.

RESULTADOS

1.- Efecto de la resina glicosídica sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*.

En estudios previos se demostró que la resina glicosídica, aislada de *Ipomoea tricolor* (10 µg/ml) presentaba una inhibición del 87% sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* (Anaya et al., 1990). En el presente trabajo se examinó el efecto de la resina sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli* a diferentes tiempos y los resultados se indican en la Figura 3A. El máximo crecimiento medido como longitud radicular, se observó entre 2 y 3 días, y no hubo diferencia significativa entre 3 y 4 días. En presencia de la resina glicosídica el crecimiento radicular se inhibió 82.1%, 88.7% y 87.2% a los 2, 3 y 4 días, respectivamente. Con respecto al peso fresco de las radículas, éste fue mayor a 3 días comparado con 2 y 4 días (Figura 3B), y en presencia de la resina el peso fresco de las radículas presentó una inhibición de 78.3%, 96.9% y 96.1% a 2, 3 y 4 días, respectivamente. De acuerdo a estos resultados, el tiempo que se eligió para la obtención de la preparación microsomal y las vesículas de membrana plasmática fue el de 3 días de crecimiento de la radícula.

CRECIMIENTO RADICULAR

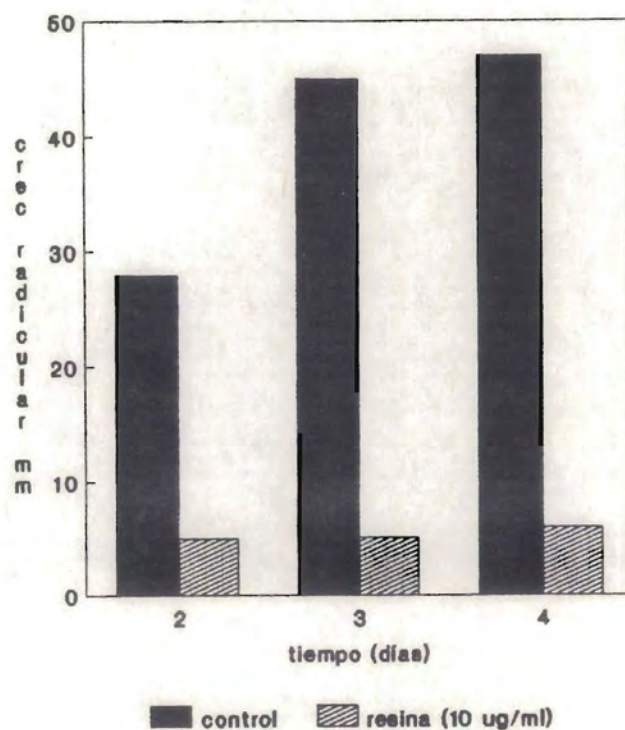


FIGURA 3A. Efecto de la resina glicosídica (10 µg/ml) sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*. La resina se disolvió en cloruro de metileno. El control creció solamente en presencia de agua (el disolvente no estuvo presente en el control porque en experimentos anteriores no presentó diferencias significativas con el control crecido en agua).

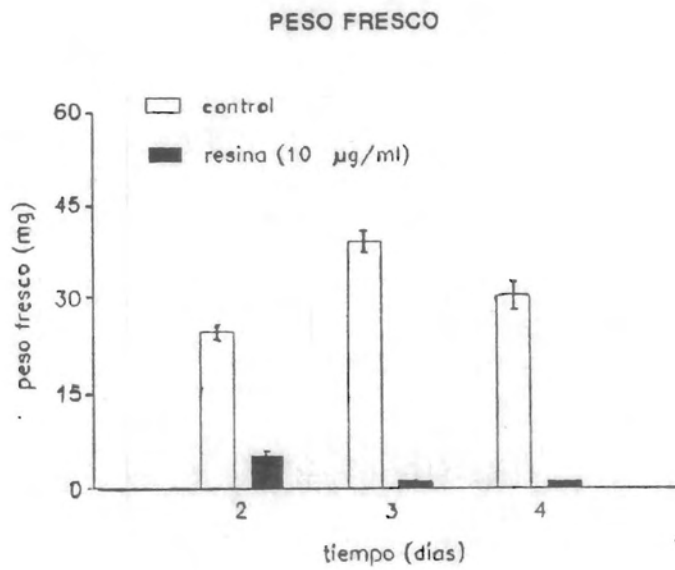


FIGURA 3B. Peso fresco de las radículas de *Echinochloa crusgalli* a 2, 3 y 4 días de crecimiento. La resina se disolvió en cloruro de metileno.

2.- Caracterización de la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal de radículas de *E. crusgalli*.

La fracción microsomal de las radículas de *E. crusgalli* se obtuvo como se describió en Materiales y Métodos (Esquema 1). Para establecer en la preparación, las condiciones de linealidad de la reacción enzimática con respecto al tiempo, se midió la hidrólisis de ATP por liberación de Pi. En la curva se observa que la hidrólisis fue lineal en un rango de 2 hrs (Figura 4). El tiempo que se eligió para las mediciones posteriores fue de 30 min, porque se encontró dentro de un rango lineal y con una sensibilidad de absorbencia adecuada, según el método de Chifflet (González-Romo et al., 1992).

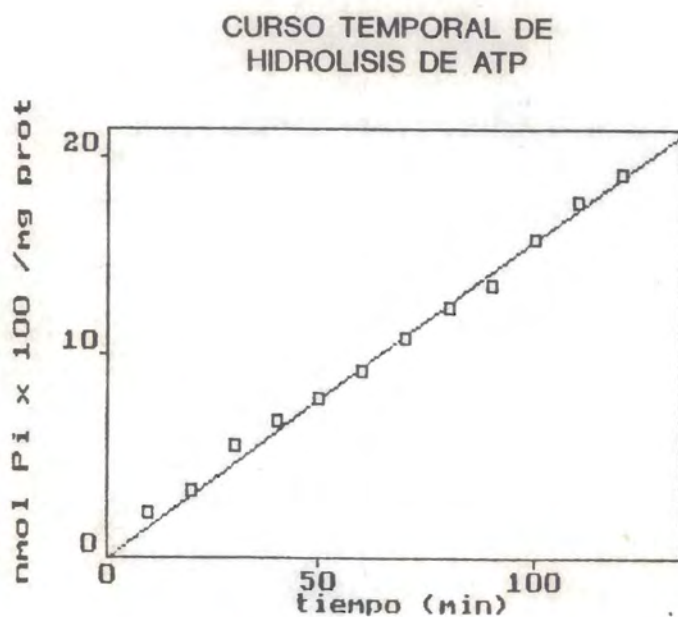


FIGURA 4. Curso temporal de la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal. Se utilizó 1 μ g de proteína para las mediciones de actividad enzimática. La temperatura del medio de hidrólisis fue de 30 °C.

Estabilidad de la actividad de hidrólisis de ATP en la preparación microsomal.

Se midió la estabilidad de la capacidad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal después de haberla mantenido en congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un intervalo de 0 a 10 días. En los primeros 5 días se presentó una ligera disminución desde 531.3 nmol Pi/min/mg a 502.1 nmol Pi/min/mg en la actividad de hidrólisis de ATP de la preparación; sin embargo, a los 10 días se observó una pérdida del 20% de su actividad (Figura 5). Debido a estos resultados la cuantificación de la actividad se realizó dentro del período de una semana.

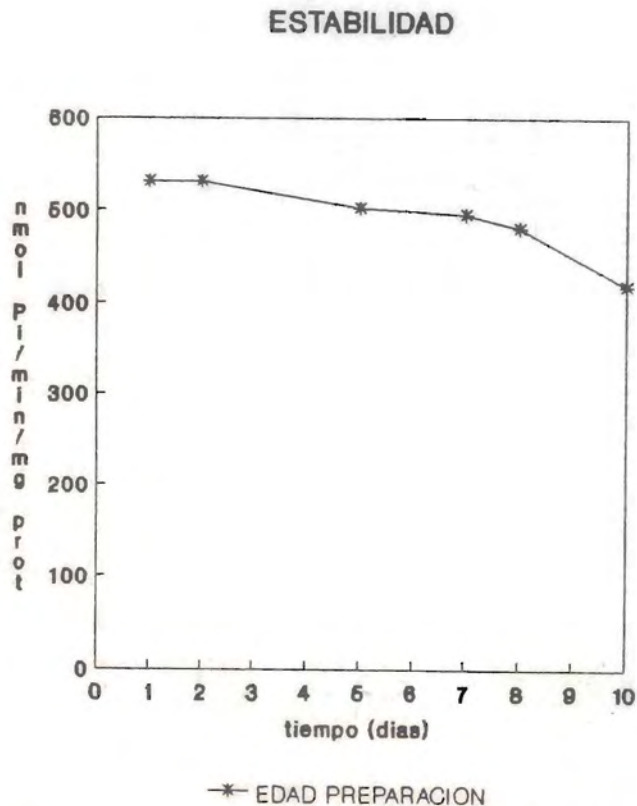


FIGURA 5. Estabilidad de la actividad de ATPasa en la fracción microsomal en tiempos de almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Identificación de los componentes responsables de la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal.

Considerando que varias enzimas podrían ser las responsables de la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal, se ensayó la sensibilidad de la preparación a inhibidores específicos, para identificar los posibles componentes (Tabla 3). Los resultados indicaron que existen cuatro componentes que hidrolizan ATP en los microsomas. La actividad total de la preparación fue de 528.1 nmol Pi/min/mg, que disminuyó un 13.9% cuando se añadió vanadato (inhibidor de la ATPasa de membrana plasmática) al medio de reacción, por lo que la ATPasa de membrana plasmática contribuyó con 73.3 nmol Pi/min/mg. En presencia de nitrato (inhibidor de la ATPasa de tonoplasto), la actividad se inhibió 44.0%, lo que sugiere que la ATPasa de tonoplasto contribuyó con 232.8 nmol Pi/min/mg. También existió contribución por la ATPasa mitocondrial y por la fosfatasa ácida, porque se observó una inhibición de 32.7% en presencia de la mezcla de azida y molibdato (inhibidores de la ATPasa de mitocondria y de la fosfatasa ácida, respectivamente), y su contribución fue de 172.9 nmol Pi/min/mg.

TABLA 3.

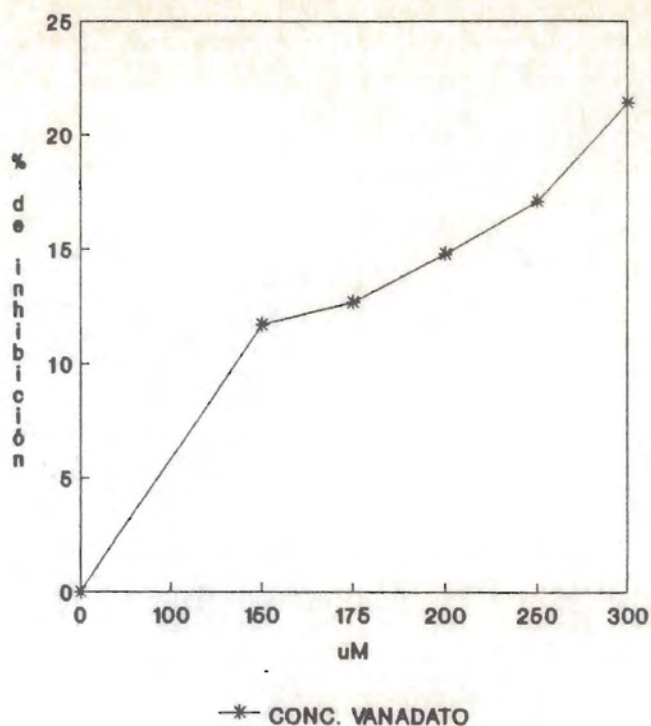
ACTIVIDAD DE HIDROLISIS DE ATP POR LA FRACCION MICROSOMAL
DE RADICULA DE *Echinochloa crusgalli*

ACTIVIDAD	HIDROLISIS DE ATP (nmol Pi/min/mg)	INHIBICION (%)
Sens a Na_3VO_4 150 μM (ATPasa de M. plasmática)	73.3 ^a \pm 0.8	13.9*
Sens a KNO_3 100 mM (ATPasa de Tonoplasto)	232.8 ^a \pm 5.5	44.0*
Sens a $\text{NaN}_3 + \text{Na}_2\text{MoO}_4$ 2 mM c/u (ATPasa mitocondrial y Fosfatasa ácida)	172.9 ^a \pm 4.9	32.7*
Total	528.1 \pm 17.3	

* $P < 0.05$

^a La actividad de ATPasa sensible al inhibidor se calculó como la diferencia entre la actividad total menos la actividad en presencia de los inhibidores correspondientes.

Posteriormente, se decidió determinar la concentración óptima de inhibición del vanadato (inhibidor de la ATPasa de membrana plasmática) sobre la hidrólisis de ATP. En la Figura 6, se observa que el porcentaje de inhibición obtenido se incrementó en forma dependiente de la concentración del inhibidor, obteniéndose una inhibición máxima de aproximadamente 20% a 300 μM de vanadato. En los experimentos subsecuentes se utilizó 250 μM de vanadato considerando que no constituye una concentración demasiado alta que pudiera actuar de manera poco específica en la preparación (González-Romo et al., 1992).



P < 0.05

FIGURA 6. Efecto del vanadato sobre la hidrólisis de ATP de la fracción microsomal. Se utilizaron diferentes concentraciones del inhibidor (150 a 300 μM).

3.- Efecto de la resina glicosídica sobre la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal.

Selección del disolvente de la resina glicosídica y su efecto en la actividad hidrolítica en la fracción microsomal.

Después de haber establecido las condiciones de medición de actividad hidrolítica en la preparación, se procedió a examinar el efecto de la resina sobre la fracción microsomal. La insolubilidad de este compuesto en agua llevó a determinar el uso del mejor disolvente. Como se observa en la Figura 7, el cloruro de metileno

presentó un efecto con grandes variaciones sobre la hidrólisis de ATP a través de todas las concentraciones ensayadas del disolvente (4, 8 y 13.3%); por el contrario, la dimetilformamida (DMF) mantuvo un efecto consistente, alcanzando una inhibición del 18.3% a una concentración de 13.3% del disolvente. Estos resultados llevaron a establecer que el disolvente de la resina fuera la dimetilformamida al 1.3%.

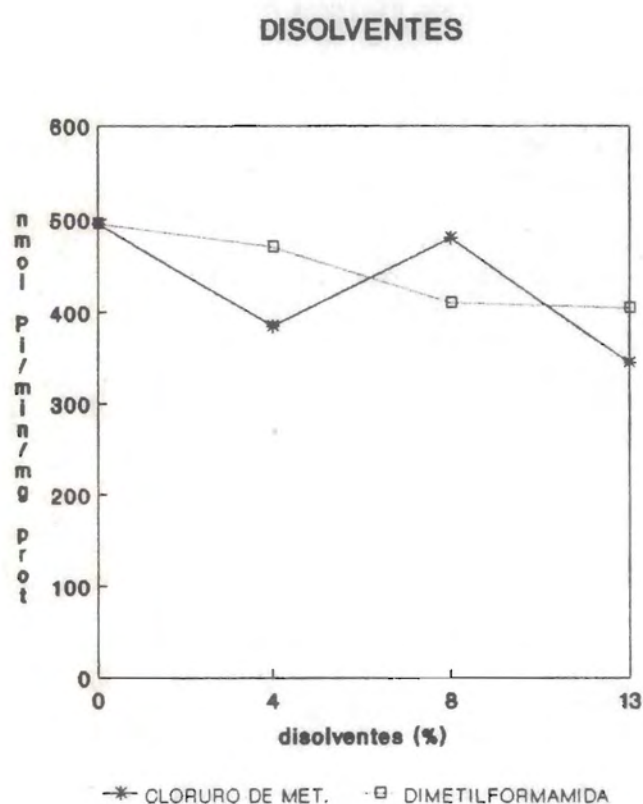
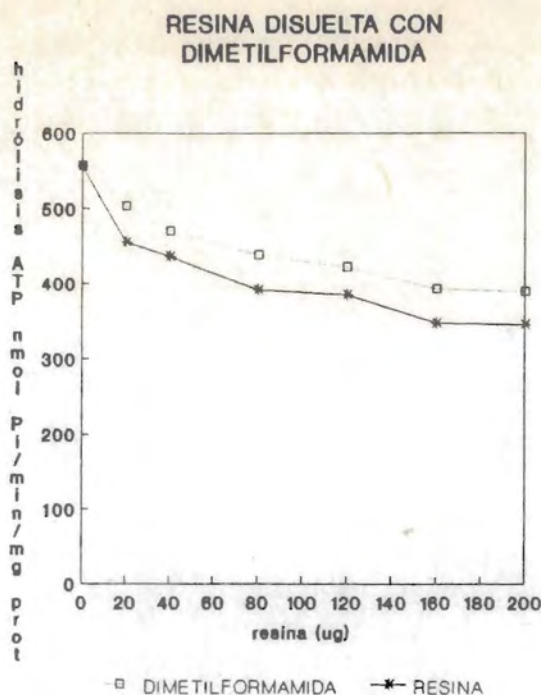


FIGURA 7. Sensibilidad de la hidrólisis de ATP al cloruro de metileno y dimetilformamida en la fracción microsomal a tres concentraciones diferentes de los disolventes. Medición de la actividad de hidrólisis de ATP a 30 min y 30 °C.

Cuantificación del efecto de la resina glicosídica sobre la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal utilizando dimetilformamida como disolvente.

La resina se utilizó en un rango de concentración de 20 a 200 μg en el medio de hidrólisis de ATP de los microsomas. En presencia de la resina glicosídica la actividad hidrolítica de ATP se inhibió en forma dependiente de la concentración (de 18.2% a 38.1%). Sin embargo, al examinar el efecto de la DMF se observó una reducción similar en la capacidad de hidrólisis de la preparación (de 9.8 a 30.1%) (Figura 8). La diferencia entre estas dos inhibiciones y por lo tanto el efecto de la resina fue del 8% y constante a todas las concentraciones examinadas. La concentración de resina elegida para los siguientes experimentos fue de 40 μg , considerando que es una concentración pequeña que puede actuar de manera más específica sobre la preparación.



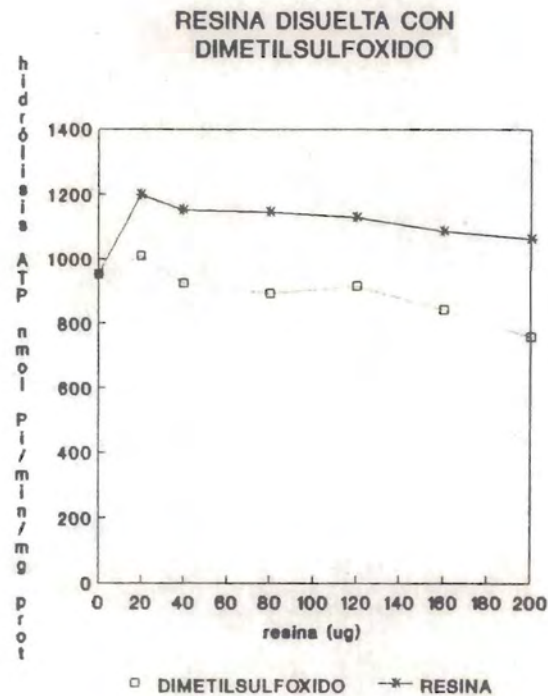
P < 0.05 (resina)

FIGURA 8. Efecto de la resina sobre la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal. La resina se utilizó a concentraciones de 20 a 200 μg (el compuesto se solubilizó en DMF 0.7% a 6.7%, respectivamente).

Cuantificación del efecto de la resina glicosídica utilizando dimetilsulfóxido como disolvente sobre la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal.

Como otro posible disolvente de la resina se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) y se estableció su efecto sobre la hidrólisis de ATP. Esta selección se basó en su amplia utilización en sistemas biológicos y por el efecto inhibitorio que presentó la dimetilformamida sobre la preparación. Se observó que la resina (20 a 200 μg) manifestó una estimulación del 12% al 20% sobre la hidrólisis de ATP a todas las concentraciones ensayadas con el disolvente (0.7 a 6.7%) (Figura 9). Este incremento en la actividad de hidrólisis en presencia de la resina disuelta con DMSO puede

haberse originado como una estimulación en alguno(s) de los componentes hidrolíticos de la preparación microsomal. Este resultado determinó que el disolvente seleccionado para la resina fuera la dimetilformamida.



$P < 0.05$ (resina)

FIGURA 9. Efecto del dimetilsulfóxido sobre la actividad de ATPasa en la fracción microsomal. La resina (20 a 200 μg) se solubilizó en este disolvente.

Efecto de la preincubación de la fracción microsomal con la resina glicosídica.

Para obtener efectos mayores en la inhibición de las enzimas que hidrolizan ATP, algunos autores las preincubaban con el inhibidor antes de iniciar la reacción de hidrólisis por adición de ATP



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

(Serrano, 1990). De acuerdo con esto, se preincubó la resina para determinar si su efecto inhibitorio aumentaba. En la Figura 10 se observa que la resina provocó una disminución constante de la hidrólisis de ATP (10%) independientemente del tiempo de preincubación (desde 15 min hasta 1 h), es decir el efecto inhibitorio de la resina se incrementó únicamente un 2% como consecuencia de la preincubación (inhibición del 8% sin preincubación vs. inhibición del 10% con preincubación). Debido a que el pequeño incremento en la inhibición presentada por la resina fue similar en todos los tiempos de preincubación realizados, se decidió preincubarla 15 min, para los experimentos siguientes.

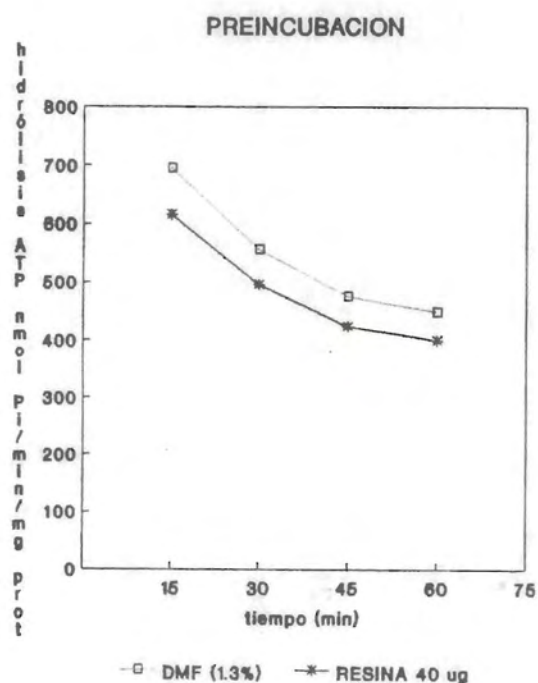


FIGURA 10. Establecimiento de las condiciones óptimas de preincubación con la resina. 1ug de proteína microsomal de radícula se preincubó a los tiempos indicados en presencia del compuesto señalado en el medio de reacción. La concentración de resina fue de 40 μ g.

Sitio de acción de la resina glicosídica sobre los componentes hidrolíticos de ATP de la fracción microsomal.

Debido a que la fracción microsomal contiene varios componentes que pueden hidrolizar ATP, y que la resina puede actuar sobre uno ó más de ellos, se resolvió usar inhibidores selectivos de tales componentes hidrolíticos. Se realizó un experimento para determinar el efecto de la resina sobre la actividad de dos ó tres enzimas que producen Pi simultáneamente, inhibiendo únicamente uno de los componentes de la actividad de ATPasa con un inhibidor específico (Tabla 4). En presencia de vanadato, la actividad de hidrólisis de ATP de la membrana plasmática fue inhibida; la actividad remanente correspondió a las enzimas no inhibidas, es decir las ATPasas de tonoplasto y la mitocondrial, así como la fosfatasa ácida. Cuando se añadió vanadato y resina disuelta en dimetilformamida, tal actividad remanente se estimuló un 6.2%, lo que sugiere, que la resina estimuló a alguna(s) de las tres enzimas no inhibidas con vanadato.

Por otro lado, la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de la resina más azida y molibdato, activó 8.2% a las ATPasas microsomales (tonoplasto y/o membrana plasmática). Asimismo, la actividad remanente de hidrólisis de ATP en presencia de nitrato más la resina, tuvo un efecto inhibitorio de 7% sobre las enzimas de membrana plasmática, mitocondria y fosfatasa ácida, que son insensibles al inhibidor. Estos datos sugieren que la resina tiene posiblemente dos formas de acción una estimulatoria y la otra inhibitoria, sobre diferentes componentes hidrolíticos de ATP, sin embargo no se pudo establecer la identidad inequívoca de estos

efectos y sus respectivos blancos.

Tabla 4.

EFFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION MICROSOMAL EN PRESENCIA DE INHIBIDORES ESPECIFICOS

ACTIVIDAD	HIDROLISIS DE ATP (nmol Pi/min/mg)	ACT SENS RESINA	ENZIMAS NO INHIBIDAS
Control	1351.7 ± 4.3		
Insens a Na ₃ VO ₄ + DMF	911.8 ^a ± 4.5 (100%)		Tonoplasto Mitochondrial
Insens a Na ₃ VO ₄ + DMF + Resina	968.9 ^a ± 0.0 (106.2%)	+57.1	F. ácida

Insens a NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ + DMF	571.6 ^a ± 0.3 (100%)		Tonoplasto M. plasmática
Insens a NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ + DMF + Resina	618.5 ^a ± 0.4 (108.2%)	+46.9	

Insens a KNO ₃ + DMF	990.5 ^a ± 0.3 (100%)		M. Plasmática Mitochondrial
Insens a KNO ₃ + DMF + Resina	923.7 ^a ± 8.6 (93.2%)	-66.8*	F. ácida
Σ Actividades parciales (inhibidores) = 1358.6 nmol Pi/min/mg			

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa insensible al inhibidor: es la actividad medida en presencia del inhibidor correspondiente.

Concentraciones de inhibidores: vanadato 250 µM; nitrato 100 mM; azida y molibdato 2 mM c/u. Disolvente (DMF) 1.3% y resina 40 µg.

En otro tipo de experimento, se determinó el efecto de la resina sobre una sola enzima, inhibiendo para ello a todas las otras con sus respectivos inhibidores. Los resultados obtenidos confirmaron lo que se obtuvo en el experimento anterior, o sea que existieron efectos diferenciales de la resina sobre los componentes enzimáticos presentes en la fracción microsomal. También se puso en evidencia que la actividad de la ATPasa de tonoplasto en presencia de la resina, se estimulaba en 8.9%. Además, la actividad de la ATPasa mitocondrial y/o la fosfatasa ácida, fueron estimuladas un 20.7% en presencia de la resina. Por el contrario, la actividad de hidrólisis de la ATPasa de membrana plasmática fue inhibida 9.1% por la resina (Tabla 5). La suma de la inhibición total producida por la mezcla de los inhibidores, fue mayor al control. Esto posiblemente ocurrió por una interacción de los inhibidores entre sí a inhibiciones cruzadas. De aquí que estos resultados no demuestren inequívocamente la identidad de los sitios de acción de la resina.

Tabla 5.

EFFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP EN LA FRACCION MICROSOMAL EN PRESENCIA DE MEZCLAS DE INHIBIDORES ESPECIFICOS

ACTIVIDAD	HIDROLISIS DE ATP (nmol Pi/min/mg)	ACT SENS RESINA	ENZIMAS NO INHIBIDAS
Control DMF	1225.5 ± 0.3		
Insens a Na ₃ VO ₄ + NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ + DMF	588.9 ^a ± 3.1 (100%)		Tonoplasto
Insens a Na ₃ VO ₄ + NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ + DMF + Resina	641.1 ^a ± 3.9 (108.9%)	+52.2*	

Insens a KNO ₃ + Na ₃ VO ₄ + DMF	598.3 ^a ± 2.8 (100 %)		Mitochondrial F. ácida
Insens a KNO ₃ + Na ₃ VO ₄ + DMF + Resina	722.2 ^a ± 2.3 (120.7%)	+123.9*	

Insens a KNO ₃ + NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ + DMF	553.3 ^a ± 3.9 (100%)		M. plasmática
Insens a KNO ₃ + NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ + DMF + Resina	503.0 ^a ± 2.5 (90.9%)	-50.3*	

Control = 1331.1 nmol Pi/min/mg			
Σ Actividades parciales (inhibidores) = 1927.3 nmol Pi/min/mg			
Σ Efectos de la resina = 8.9 + 20.7 - 9.1 = 20.5			

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa insensible al inhibidor: es la actividad medida en presencia del inhibidor correspondiente.

Concentraciones de inhibidores: vanadato 250 μM; nitrato 100 mM; azida y molibdato 2 mM c/u. Disolvente (DMF) 1.3% y resina 40 μg.

Aun cuando la resina presentó un efecto inhibitorio solo sobre la ATPasa de membrana plasmática del 9.1% en la fracción microsomal (Tabla 5), es posible que el efecto inhibitorio real fuera mayor y que estuviera enmascarado por el efecto estimulador de la resina sobre la actividad de las otras enzimas, ó bien por una especificidad cruzada de los inhibidores ó posibles interacciones entre ellos. Por estas razones, se realizó la purificación de las vesículas de membrana plasmática para determinar más precisamente el efecto de la resina sobre estas membranas.

4.- Purificación de las vesículas de membrana plasmática de radícula de *E. crugalli* por gradientes de sacarosa.

Los resultados con las vesículas purificadas en gradientes de sacarosa (Tabla 6), muestran que la cantidad de proteína total recuperada en la interfase 34-45% del gradiente de sacarosa (vesículas de membrana plasmática) fue del 0.1%. La preparación así obtenida presentó una actividad específica total de 346.0 nmol Pi/min/mg, menor a la de la fracción microsomal que fue de 610.3 nmol Pi/min/mg. En la interfase, la hidrólisis de ATP disminuyó 18.6% en presencia de vanadato (inhibidor de la ATPasa de membrana plasmática) en relación con el 12.2% de la fracción microsomal, pero fue menor a la inhibición del 27.6% que presentó el pellet. Al utilizar nitrato (inhibidor de la ATPasa de tonoplasto), la hidrólisis en la interfase se inhibió únicamente 7.6%, en comparación con el 41.4% que presentó la fracción microsomal. A

pesar de la purificación se observó que la ATPasa de mitocondria y la fosfatasa ácida continuaron contribuyendo a la hidrólisis de ATP puesto que la mezcla de azida y molibdato (inhibidores de la ATPasa mitocondrial y de la fosfata ácida respectivamente), las inhibió aproximadamente 50%. Estos resultados nos indicaron que la preparación de vesículas recuperadas en la interfase 34-45% del gradiente de sacarosa, no correspondía únicamente a vesículas de membrana plasmática sino también a vesículas de mitocondria y a vesículas de tonoplasto. También se observó que gran parte de la actividad se registró en el pellet. A pesar de ello, el gradiente de sacarosa utilizado, permitió que se obtuviera en la preparación una importante disminución de las vesículas de tonoplasto. Considerando estos datos, se asumió que no existía una separación diferencial ventajosa de las vesículas de membrana plasmática por el gradiente de sacarosa, por lo cual se resolvió utilizar otro método de aislamiento.

Tabla 6.

SENSIBILIDAD DE LA HIDROLISIS DE ATP A INHIBIDORES ESPECIFICOS
POR LAS VESICULAS PURIFICADAS EN GRADIENTES DE SACAROSA

	FRACCION MICROSOMAL	INTERFASE 34-45%	PELLET
Proteína total (μ g)	2,724.0	64.0	333.2
Recuperación (%)		0.1	12.2
Control (nmol Pi/min/mg)	610.3 \pm 26.8 (100.0%)	346.0 \pm 2.4 (100.0%)	632.2 \pm 4.8 (100.0%)
Vanadato 250 μ M (nmol Pi/min/mg)	74.7 ^a \pm 4.9 (12.2%)	64.4 ^a \pm 2.4 (18.6%)	174.7 ^a \pm 0.0 (27.6%)
Nitrato 100 mM (nmol Pi/min/mg)	252.9 ^a \pm 4.0 (41.4%)	26.5 ^a \pm 3.2 (7.6%)	74.6 ^a \pm 5.7 (11.8%)
Azida/Molibdato 2 mM c/u (nmol Pi/min/mg)	333.3 ^a \pm 4.1 (54.6%)	175.9 ^a \pm 6.5 (50.8%)	404.4 ^a \pm 6.5 (64.0%)

^a La actividad de ATPasa sensible al inhibidor se calculó como la diferencia entre la actividad total menos la actividad en presencia del inhibidor correspondiente.

Purificación de las vesículas de membrana plasmática de radícula de *E. crugalli* por partición de fases.

En la Tabla 7, se indican los resultados del método de purificación para la obtención de vesículas de membrana plasmática basado en la partición en un sistema de polímeros en dos fases, en una relación de % Dextrán/PEG 6.2/6.2 y KCl 3 mM. Con este método, se obtuvo una recuperación del 29.9% de proteína total en las

vesículas purificadas y un aumento en la actividad de hidrólisis de ATP (1115.1 nmol Pi/min/mg) con respecto al control (fracción microsomal con 881.8 nmol Pi/min/mg). En presencia de vanadato, la hidrólisis de ATP en las vesículas aisladas (U_2) fue inhibida 24.7%, lo que corresponde a una contribución de la ATPasa de membrana plasmática de 276 nmol Pi/min/mg, es decir, hubo más sensibilidad al inhibidor en comparación con la fracción microsomal que se inhibió 18.3% y tuvo una contribución de 161.9 nmol Pi/min/mg. La sensibilidad de la ATPasa de tonoplasto al nitrato disminuyó de 26.7% en los microsomas, a 9.1% en la fracción U_2 . Por su parte, la azida y el molibdato mantuvieron su efecto de aproximadamente un 50% de inhibición, sobre la ATPasa mitocondrial y la fosfatasa ácida, las cuales contribuyeron con 510 nmol Pi/min/mg y 521.8 nmol Pi/min/mg en la fracción microsomal y U_2 , respectivamente. Con estos resultados se puso en evidencia la presencia de una mayor cantidad de vesículas de membrana plasmática en U_2 , una menor proporción de vesículas de tonoplasto, también obtenidas por el gradiente de sacarosa, y una persistente presencia de los contaminantes (ATPasa mitocondrial y fosfatasa ácida).

Tabla 7.

HIDROLISIS DE ATP DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA
PURIFICADAS POR PARTICION DE FASES EN DOS POLIMEROS

	FRACCION MICROSOMAL	FRACCION U2 % DEX/PEG 6.2/6.2 3mM KCl
Proteína total (μ g)	2,676.0	800.0
Recuperación (%)		29.9
Control (nmol Pi/min/mg)	882.1 \pm 50.5 (100.0%)	1118.6 \pm 1.1 (100.0%)
Vanadato 250 μ M (nmol Pi/min/mg)	161.9 ^a \pm 0.0 (18.3%)	276.0 ^a \pm 2.1 (24.7%) [*]
Nitrato 100 mM (nmol Pi/min/mg)	235.2 ^a \pm 0.3 (26.7%)	102.0 ^a \pm 3.9 (9.1%) [*]
Azida/Molibdato 2 mM c/u (nmol Pi/min/mg)	510.0 ^a \pm 0.0 (57.8%)	521.2 ^a \pm 0.3 (46.6%)

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa sensible al inhibidor se calculó como la diferencia entre la actividad total menos la actividad en presencia del inhibidor correspondiente.

Sinergismo entre la concentración de sales y relación de los polímeros en el método de purificación por partición de fases.

El incremento en la concentración de sales (KCl) y la relación de los polímeros (% Dextrán/PEG), actúan generalmente de forma sinérgica en la separación de las vesículas de membrana plasmática (Larson et al., 1987). En la Tabla 8 se muestra el

efecto de KCl 5 mM y tres diferentes relaciones de % Dextrán/PEG sobre la partición de las membranas vesiculadas. La relación 7/7 originó la preparación más pura, porque 78.6% de la actividad de hidrólisis de ATP fue producida por las vesículas de membrana plasmática (sensibles a vanadato), comparada con el 50% obtenido con las otras relaciones probadas de polímeros. Además, solamente un 11.0% de la actividad total correspondió a la ATPasa mitocondrial y a la fosfatasa ácida (sensibles a azida y molibdato), en relación con el 37.6%, 47.1% y 53.3% obtenido tanto con las otras dos relaciones de polímeros como en los microsomas. Finalmente, la contribución de la ATPasa de tonoplasto a la hidrólisis de ATP (en presencia de nitrato) fue únicamente de 4.7%, lo que determinó que las vesículas de tonoplasto presentaran un decremento en su proporción, en comparación con la obtenida en la relación de los polímeros 6.2/6.2 y al gradiente de sacarosa. Es necesario recalcar, que existió una significativa disminución de los contaminantes (ATPasa mitocondrial y fosfatasa ácida) en las vesículas. Asimismo, estos resultados demostraron que la mayor purificación de las vesículas de membrana plasmática se obtuvo en la relación 7/7 de los polímeros en el método de partición.

La concentración de proteína se cuantificó a través de las relaciones de polímeros ensayadas (6.2, 7.0 y 7.5%), observándose que la cantidad de proteína total recuperada fue similar en todas las concentraciones de polímeros experimentadas.

Tabla 8.

EFFECTO DE LA RELACION DE POLIMEROS SOBRE LAS VESICULAS (U₂)
OBTENIDAS POR EL METODO DE PARTICION DE FASES

	% DEXTRAN T500/PEG3350 (5mM KCl)			
	F.M.	6.2/6.2	7.0/7.0	7.5/7.5
Proteína total (μ g)	3,029.1	100.2	100.0	98.7
Recuperación (%)		10.0	9.9	9.8
Control	312.0 \pm 2.0 (nmol Pi/min/mg)(100.0%)	554.8 \pm 20.3 (100.0%)	324.5 \pm 9.0 (100.0%)	476.8 \pm 4.7 (100.0%)
Vanadato	59.6 ^a \pm 1.9 (nmolPi/min/mg)(19.1%)	280.1 ^a \pm 0.0 (50.4%)	255.0 ^a \pm 15.8 (78.6%)*	216.5 ^a \pm 6.8 (45.4%)
Nitrato	94.0 ^a \pm 1.2 (nmol Pi/min/mg)(30.1%)	21.9 ^a \pm 5.3 (3.9%)	15.4 ^a \pm 0.7 (4.7%)*	90.5 ^a \pm 9.8 (19.0%)
Azida/Mo.	166.3 ^a \pm 0.8 (nmol Pi/min/mg)(53.3%)	261.5 ^a \pm 0.4 (47.1%)	36.0 ^a \pm 3.0 (11.0%)*	179.1 ^a \pm 3.4 (37.6%)

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa sensible al inhibidor se calculó como la diferencia entre la actividad total menos la actividad en presencia del inhibidor correspondiente.

Concentraciones de inhibidores: vanadato 250 μ M; nitrato 100 mM; azida y molibdato 2 mM c/u.

Enriquecimiento de las vesículas de membrana plasmática por una segunda partición de fases.

Con el propósito de obtener un mayor enriquecimiento de las vesículas de membrana plasmática, evaluado por sensibilidad a vanadato e insensibilidad a otros inhibidores, se realizó una segunda partición en un sistema de polímeros en dos fases y se obtuvo la fracción U₃ (Tabla 9). En esta fracción, la cantidad de proteína total que se obtuvo fue de 33.6 µg partiendo de 266.7 µg en U₂, lo que correspondió a una recuperación del 1.3%. Asimismo, se incrementó la contribución de la ATPasa de membrana plasmática de 75.3% a 88.0% (actividad sensible a vanadato). Se eliminó totalmente la contribución de la ATPasa de tonoplasto a la hidrólisis de ATP (en presencia de nitrato no existió inhibición). La ATPasa mitocondrial y la fosfatasa ácida (sensibles a azida y molibdato) contribuyeron con 10.0% a la actividad hidrolítica en forma similar a la presente en U₂. Estos resultados confirmaron que por este método se obtuvo una purificación aceptable de las vesículas de membrana plasmática y por lo tanto una predominante actividad de la ATPasa de membrana plasmática en relación con las otras enzimas que hidrolizan ATP (ATPasa de tonoplasto, ATPasa mitocondrial y fosfatasa ácida).

Tabla 9.

ENRIQUECIMIENTO DE LAS VESICULAS U₂ POR UNA SEGUNDA
PARTICION DE FASES

	F.M.	U ₂	U ₃
Proteína total (µg)	2,532.0	266.7	33.6
Recuperación (%)		10.5	1.3
Control (nmol Pi/min/mg)	565.9 ± 0.3 (100.0%)	432.0 ± 1.9 (100.0%)	843.5 ± 0.6 (100.0%)
Vanadato 250 µM (nmol Pi/min/mg)	104.0 ^a ± 0.3 (18.3%)	325.3 ^a ± 0.6 (75.3%)	742.1 ^a ± 1.6 (88.0%)*
Nitrato 100 mM (nmol Pi/min/mg)	169.5 ^a ± 0.0 (30.0%)	18.1 ^a ± 0.3 (4.1%)	- 0.8 ^a ± 0.06 (0.3% +)
Azida/Molibdato 2 mM c/u (nmol Pi/min/mg)	295.1 ^a ± 0.3 (52.1%)	49.2 ^a ± 0.3 (11.3%)	84.7 ^a ± 0.7 (10.0%)

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa sensible al inhibidor se calculó como la diferencia entre la actividad total menos la actividad en presencia del inhibidor correspondiente.

5.- Efecto de la resina sobre las vesículas purificadas de membrana plasmática.

Comparación del efecto de la resina glicosídica sobre la actividad hidrolítica en las fracciones U_2 y U_3 de las vesículas purificadas de membrana plasmática.

Una vez que se obtuvieron vesículas purificadas de membrana plasmática en las que prácticamente el 90% de la hidrólisis de ATP provenía de la ATPasa de membrana plasmática (fracción U_3), se procedió a cuantificar el efecto de la resina sobre la hidrólisis de ATP. Se encontró que la resina (40 μ g) provocó una inhibición del 18.1% y que la DMF tuvo un efecto inhibitorio del 7.4% sobre la fracción U_2 . Por el contrario, en la fracción U_3 la resina incrementó su efecto inhibitorio hasta un 31.6% y la DMF no tuvo un efecto significativo (Tabla 10). El disolvente de la resina manifestó un efecto sobre U_2 pero sobre U_3 , posiblemente porque la fracción U_2 se encontraba constituida por una mayor proporción de las otras vesículas (tonoplasto y contaminantes) que pudieron haber interactuado con el disolvente, en forma tal que enmascarara el efecto inhibitorio de la resina sobre la actividad de la ATPasa de membrana plasmática en comparación con la fracción U_3 , enriquecida como se ha descrito, en vesículas de membrana plasmática.

Tabla 10.

EFFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP
DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA
PURIFICADAS POR UNA DOBLE PARTICION DE FASES

	F.M.	U ₂	U ₃
Control (nmol Pi/min/mg)	565.9 ± 0.3 (100.0%)	432.0 ± 1.9 (100.0%)	843.5 ± 0.6 (100.0%)
Vanadato 250 μM (nmoles Pi/min/mg)	104.0 ^a ± 0.3 (18.3%)	325.3 ^a ± 0.6 (75.3%)	742.1 ^a ± 1.6 (88.0%)*
DMF 1.3% (nmol Pi/min/mg)	86.5 ^a ± 0.3 (15.2%)	32.0 ^a ± 0.6 (7.4%)	-2.2 ^a ± 0.3 (0.3% +)*
Resina 40 μg (nmol Pi/min/mg)	59.5 ^a ± 0.3 (10.5%)	73.2 ^a ± 6.2 (18.1%)	266.7 ^a ± 0.3 (31.6%)*

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa sensible al inhibidor (DMF ó resina) se calculó como la diferencia entre la actividad total menos la actividad en presencia del vanadato, DMF ó resina.

Efecto de la resina glicosídica sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la fracción U₃.

Para confirmar que la ATPasa de membrana plasmática efectivamente es el componente afectado por la resina en las vesículas purificadas, se utilizaron inhibidores específicos para cada una de las enzimas sobre la hidrólisis de ATP en preparaciones de la fracción U₃, excepto nitrato (ATPasa de tonoplasto, no presente en la preparación) (Tabla 11). El diseño experimental fue similar al descrito en la Tabla 4. En presencia de vanadato, la resina estimuló la hidrólisis de ATP en 16.1% sobre la ATPasa mitocondrial y/o la fosfatasa ácida. Asimismo, la presencia de resina más azida y molibdato, tuvo un efecto inhibitorio de 30.1% sobre la ATPasa de membrana plasmática, valor muy cercano al 31.6% de provocado por la resina en el experimento de la Tabla 10, con un protocolo experimental complementario. Con estos datos se estableció que la ATPasa de membrana plasmática era en efecto la enzima hidrolítica de ATP que es inhibida por la resina.

Tabla 11.

EFFECTO DE LA RESINA GLICOSIDICA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP DE LA FRACCION U₃ (M.P.) EN PRESENCIA DE INHIBIDORES ESPECIFICOS

ACTIVIDAD	HIDROLISIS ATP (nmol Pi/min/mg)	ACT SENS RESINA	ENZIMAS NO INHIBIDAS
Control	1077.3 ± 1.0		
Insens a Na ₃ VO ₄ (250 μM) + DMF (1.3%)	132.6 ^a ± 0.4 (100%)		
Insens a Na ₃ VO ₄ (250 μM) + DMF (1.3%) + Resina (40 μg)	154.0 ^a ± 0.4 (116.1%)	+21.4	Mitocondrial F. ácida

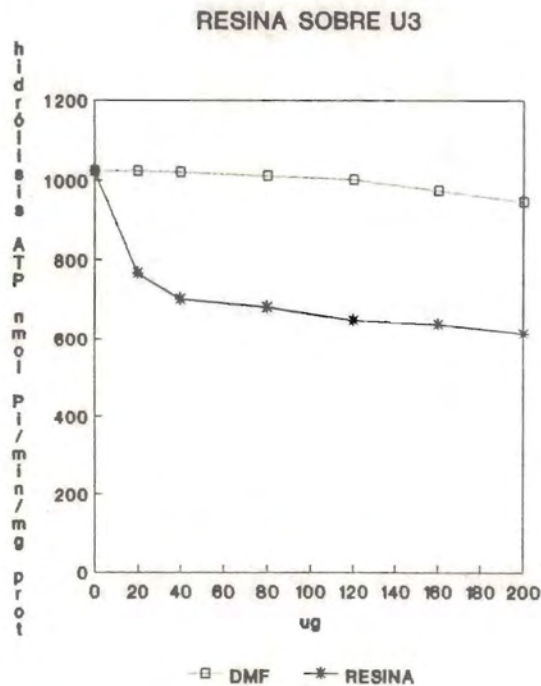
Insens a NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ (2 mM c/u) + DMF (1.3%)	965.9 ^a ± 0.4 (100%)		
Insens a NaN ₃ /Na ₂ MoO ₄ (2 mM c/u) + DMF (1.3%) + Resina (40 μg)	673.7 ^a ± 0.3 (69.7%)	-292.2*	M. plasmática
Σ Actividades parciales (inhibidores) = 1051.3 nmol Pi/min/mg			

* P < 0.05

^a La actividad de ATPasa insensible al inhibidor: es la actividad medida en presencia del inhibidor correspondiente.

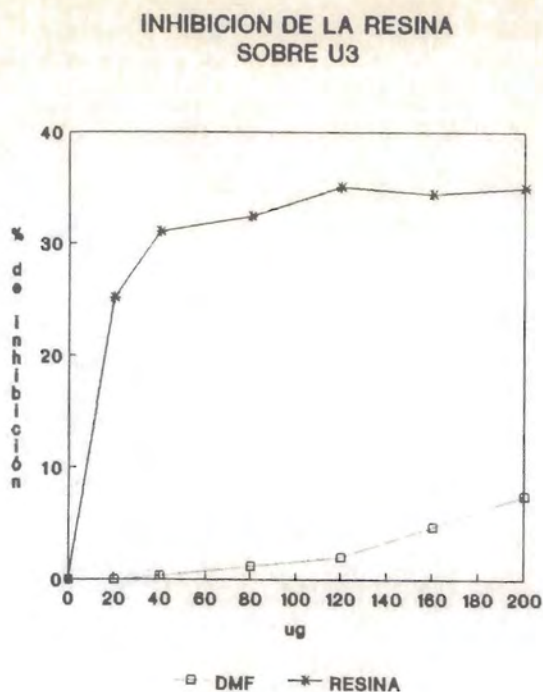
Determinación del efecto de diferentes concentraciones de la resina glicosídica sobre la actividad hidrolítica de ATP de las vesículas purificadas de membrana plasmática (U_3).

En la Figura 11A se muestra que la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de membrana plasmática disminuyó al incrementarse la concentración de la resina glicosídica en el medio de reacción. El porcentaje de inhibición osciló entre el 25% y el 35% en un rango de concentración de 20 a 200 μg (Figura 9B). En ésta preparación la dimetilformamida no presentó ningún efecto sobre la hidrólisis de ATP a concentraciones pequeñas (0.7% a 2.7% de DMF), mientras que a la concentración más alta (6.7%) inhibió un 7.4%.



$P < 0.05$ (resina)

FIGURA 11A. Efecto de la concentración de la resina glicosídica sobre la hidrólisis de ATP en las vesículas de la fracción de membrana plasmática (U_3), de radícula de *E. crusgalli*.



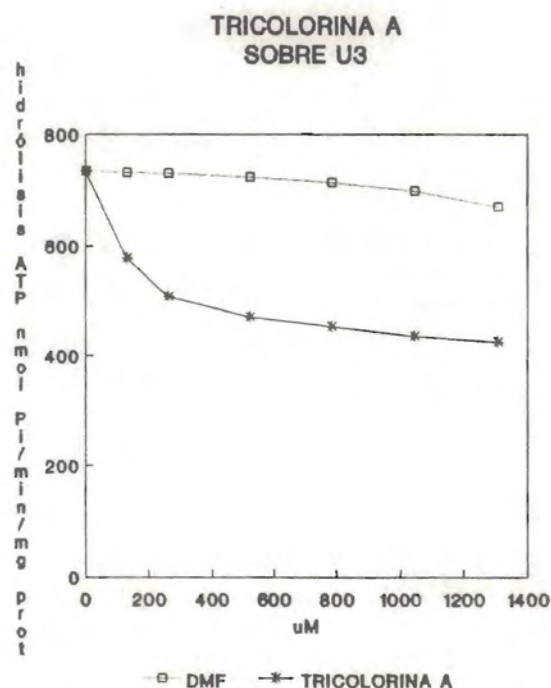
$P < 0.05$ (resina)

FIGURA 11B. Inhibición de la resina glicosídica (20 a 200 μg) sobre la actividad de hidrólisis de ATP en las vesículas de la fracción U_3 (membrana plasmática) de radícula de *E. crusgalli*.

Determinación del efecto del compuesto tricolorina A (componente de la resina glicosídica) sobre la hidrólisis de ATP de las vesículas purificadas de membrana plasmática.

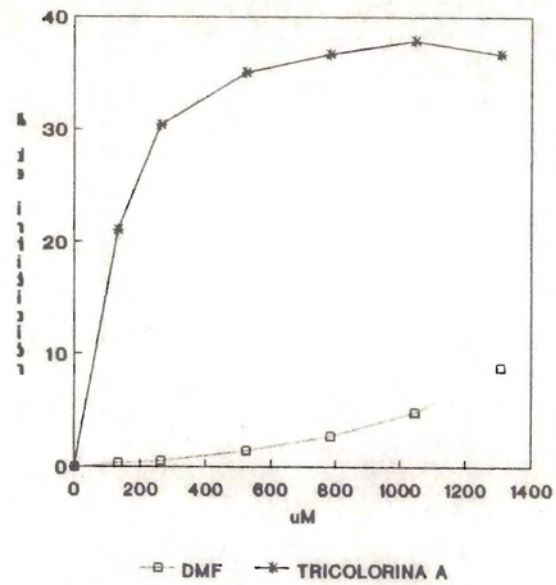
La resina glicosídica que se había estado usando hasta el experimento anterior era en realidad una mezcla de varios constituyentes. Pereda-Miranda et al. (1992) reportaron la estructura del componente mayoritario, (85%) denominado Tricolorina A. Usando este compuesto por sí sólo, se pudo determinar su efecto sobre la hidrólisis de ATP de las vesículas de membrana, lo cual permitió la estimación de su concentración molar y la comparación con el efecto de la resina glicosídica utilizada anteriormente. En

la Figura 12A se observa que la tricolorina A presente en concentraciones bajas ($<200 \mu\text{M}$) provocó una gran disminución sobre la actividad hidrolítica. Tal inhibición tuvo un aumento gradual a concentraciones crecientes ($>200 \mu\text{M}$). El porcentaje de inhibición de la tricolorina A sobre la hidrólisis se muestra en la Figura 12B. La inhibición producida es dependiente de la concentración y muy similar al de la resina (21% a 37.9% y 25% a 35%, respectivamente). La DMF presentó una inhibición del 0.3% al 8.8%, semejante a la cuantificada anteriormente con la resina. Estos resultados demostraron que la actividad presente en la preparación de resina enriquecida se deben a su principal componente, el compuesto tricolorina A.



$P < 0.05$ (tricolorina A)

FIGURA 12A. Efecto del compuesto tricolorina A (130 a 1305 μM) sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la fracción U₃ (vesículas de membrana plasmática).

INHIBICION DE TRICOLORINA A
SOBRE U₃

P < 0.05 (tricolorina A)

FIGURA 12B. Inhibición del compuesto tricolorina A (130 a 1305 μM) sobre la hidrólisis de ATP de la fracción U₃ (vesículas de membrana plasmática).

DISCUSION

Se ha demostrado que los compuestos alelopáticos pueden manifestar su efecto en la planta receptora como cambios en la germinación y el crecimiento de la radícula ó del tallo, entre otros. Estas modificaciones seguramente estan acompañadas por alteraciones en los procesos celulares. Asimismo, se sabe que existe una gran diversidad de mecanismos de acción a través de los cuales estos compuestos pueden ejercer su efecto.

En una investigación previa, que sirvió como antecedente al presente trabajo se determinó que la resina glicosídica, alelopático aislado de *Ipomoea tricolor*, inhibió hasta en 87% el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* cuando se usó a una concentración de 10 µg/ml (Anaya et al., 1990).

La ATPasa de H⁺ de membrana plasmática es esencial en el proceso de crecimiento celular debido a dos aspectos importantes: a) La teoría del crecimiento ácido postula que la acidificación del espacio apoplástico producido por la ATPasa es responsable del incremento en la plasticidad de la pared celular; b) El gradiente de protones generado por la ATPasa es la fuente energética que dirige el transporte activo de moléculas esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y azúcares. Ambas acciones de la ATPasa pueden afectar de forma importante el crecimiento radicular (Senn y Goldsmith, 1988; Altabella et al., 1990; Serrano, 1990). Con el fin de explorar los mecanismos de acción involucrados en la inhibición de la resina glicosídica sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli* se estudió el efecto de esta resina sobre

la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática.

I. Caracterización de la fracción microsomal.

La actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal obtenida de radícula de *Echinochloa crusgalli* mostró un rango de 500-1300 nmol Pi/min/mg. Esta variación posiblemente se debió a que durante el desarrollo de este trabajo se usaron dos lotes de semillas diferentes, en vista de que el porcentaje de germinación del primer lote de semillas disminuyó con el tiempo y hubo necesidad de usar un lote de semillas más frescas. Como era de esperarse la actividad de hidrólisis en los microsomas obtenidos de las radículas de este segundo lote fue mayor.

En la fracción microsomal, la capacidad hidrolítica de ATP disminuyó en relación con el tiempo de almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 5), lo que probablemente estuvo determinado por un rearrreglo de las proteínas en las vesículas de membrana (efecto de la congelación y descongelación) ó bien por la acción de las proteasas presentes en la preparación, liberadas durante la homogenización del tejido (Giannini et al., 1987). Sin embargo, la fracción microsomal mantuvo un 90% de su actividad hasta los 8 días y disminuyó significativamente a los 10 días de almacenamiento, mostrando un 80% de la actividad original, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura (O'Neill y Spanswick, 1984; Hennessey y Scarborough, 1988).

En la preparación microsomal se consideró que la presencia de

las vesículas de tonoplasto y de membrana plasmática serían las que tendrían mayor contribución debido a su mayor superficie membranal y a la densidad que ambas vesículas presentan durante el aislamiento por centrifugación diferencial. Sin embargo, no se descartó la posibilidad de encontrar vesículas de mitocondria y de otros organelos, y por lo tanto la presencia en estas membranas de ATPasas y fosfatasas como constituyentes. Los componentes hidrolíticos en la preparación fueron discernidos mediante el uso de inhibidores específicos.

Los inhibidores que afectan la actividad de la ATPasa de membrana plasmática son diversos, entre ellos se encuentran el dietilestilbestrol (DES) (Shimazaki y Kondo, 1987; Ladyzhenskaya et al., 1991) y el vanadato (Serrano, 1990). El DES es un inhibidor débil de la ATPasa de membrana plasmática y su acción afecta también a las ATPasas de mitocondria y vacuola. En cambio el vanadato es considerado como un inhibidor muy efectivo. Ha sido utilizado en un rango de concentración de 2 a 300 μM (inhibiendo entre 10 y 84% de la actividad) sobre las ATPasas de vesículas de membrana plasmática de plantas de diferentes especies (Gallagher y Leonard, 1982; Shimazaki y Kondo, 1987; Serrano, 1990; González-Romo et al., 1992). Con base en esto, en el presente estudio se seleccionó al vanadato (250 μM) como inhibidor para determinar la presencia de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en la preparación de microsomas y vesículas de membrana plasmática.

La ATPasa de tonoplasto es inhibida tanto por KSCN (Mandala y Taiz, 1986) como por KNO_3 (un 45%) (Anraku et al., 1989). El primer

inhibidor es efectivo únicamente cuando la enzima se encuentra en preparaciones puras. En cambio, el nitrato muestra su efecto sobre preparaciones no puras (fracción microsomal) ó bien sobre la enzima purificada; asimismo presenta una gran efectividad a concentraciones de 50 a 100 mM (Anraku et al., 1989; Matsuura-Endo et al., 1990; Pugin et al., 1991). Considerando esto, se seleccionó como inhibidor de la ATPasa de tonoplasto al KNO_3 (100 mM).

En las preparaciones obtenidas (fracción microsomal y vesículas purificadas de membrana plasmática) se determinó la presencia de la ATPasa mitocondrial y la fosfatasa ácida (vacuola) como contaminantes. Estas fueron detectadas por medio de la utilización de una mezcla de los inhibidores azida y molibdato (2 mM cada uno), la cual ha mostrado una gran efectividad para inhibir la actividad de estas enzimas (González-Romo et al., 1992).

Debido a la insolubilidad de la resina en agua fue necesario el uso un disolvente orgánico, específicamente se probaron el cloruro de metileno, el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF). El cloruro de metileno *per se* mostró un efecto variable sobre la hidrólisis de ATP (Fig. 7), por lo que ya no se utilizó en los experimentos siguientes. El DMSO mostró un efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolítica de la preparación (Fig. 9). Esta acción del DMSO es contraria a la estimulación descrita para la ATPasa mitocondrial de *E. coli* por Al-Shawi y Senior (1992). La resina disuelta en DMSO estimuló la actividad de hidrólisis de ATP en la fracción microsomal (Fig. 9). Este

incremento en la hidrólisis causado por la resina, puede explicarse con base en un posible aumento en la actividad de alguno de los componentes hidrolíticos de la preparación (ver pag. 77). La DMF inhibió la hidrólisis de ATP en los microsomas, de manera dependiente de la concentración (Fig. 8). A diferencia del efecto estimulatorio de la resina disuelta en DMSO, la resina en DMF inhibió la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal (8.0% de inhibición, considerando como control la actividad observada en presencia del disolvente). La razón para este efecto diferencial de la resina disuelta en DMSO y DMF, no es clara, pero tal vez este compuesto de alto peso molecular pueda adquirir diferentes arreglos de conformación en los distintos disolventes, los cuales podrían ser determinantes para una interacción con los componentes hidrolíticos de la preparación. Con base en estas pruebas, se decidió utilizar DMF como solvente en los experimentos subsecuentes.

II. Efecto de la resina glicosídica sobre los diferentes componentes hidrolíticos en la fracción microsomal.

Debido a que la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal es el resultado de la actividad conjunta de las ATPasas de membrana plasmática, de tonoplasto, mitocondrial y de fosfatasa ácida, se exploró el efecto de la resina glicosídica sobre cada una de estas enzimas. Con este fin se estudió la actividad de dos (Tabla 4) ó una (Tabla 5) enzima en presencia de los inhibidores específicos para las demás hidrolasas. Se observó que la resina tuvo efectos

diferentes sobre los componentes hidrolíticos en la fracción microsomal. La ATPasa de tonoplasto, así como la ATPasa mitocondrial y/o la fosfatasa ácida, mostraron un aumento en su actividad en presencia de la resina de 8.9% y 20.7%, respectivamente (Tabla 5) mientras que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática disminuyó 9.1% (Tabla 5). Es interesante hacer notar que las ATPasas que son estimuladas por la resina tienen una estructura similar entre sí, tanto la ATPasa de tonoplasto (Anraku et al., 1989; Matsuura-Endo et al., 1990) como la mitocondrial (Hashimoto et al., 1990), presentan dos regiones claramente diferenciables: una hidrofóbica con un canal protónico y una hidrofílica con un sitio catalítico. Sin embargo, la ATPasa de membrana plasmática está constituida por un solo polipéptido que atraviesa la membrana de 8 a 10 veces, dependiendo de la especie (Serrano, 1988; Nelson y Taiz, 1989). Estos resultados sugieren que la estructura de las ATPasas probablemente determina el efecto diferencial de la resina glicosídica sobre su actividad hidrolítica.

Considerando que la activación de las ATPasas por la resina glicosídica, se determinó en una fracción constituida por una mezcla de enzimas cuya actividad se separó farmacológicamente, la relación estructura-efecto descrita no puede tomarse como concluyente y por ello fue necesario obtener preparaciones vesiculares purificadas.

III. Caracterización de las vesículas purificadas de membrana plasmática.

Con el método de partición de fases, se encontró que la relación óptima de los polímeros para la purificación de las vesículas de membrana plasmática de radícula de *Echinochloa crusgalli* fué de 7%/7% Dextrán T-500/PEG 3350, a una concentración de KCl de 5 mM. La capacidad de hidrólisis de esta preparación, se inhibió 88% en presencia de vanadato (Tabla 9), lo que demuestra que la mayor parte de las vesículas obtenidas son de membrana plasmática. Este dato es consistente con el grado de pureza alcanzado en el aislamiento de ATPasas de membrana plasmática en otras especies, que oscila entre 60 y 90% (Dupont et al., 1981; Larson et al., 1987; Sandstrom et al., 1987; Wach et al., 1990; Coupland et al., 1991). La preparación mostró poca contaminación por otras membranas; específicamente se encontró que un 10% de la actividad hidrolítica correspondió a la ATPasa mitocondrial y/o a la fosfatasa ácida (Tabla 9). La ATPasa de tonoplasto estuvo ausente, ya que la hidrólisis de ATP no se modificó en presencia de nitrato (Tabla 9).

La actividad de hidrólisis de la preparación fue comparable a la reportada para la ATPasa de *Vigna radiata* (garbanzo) y *Avena sativa* (avena) (Sandstrom y Cleland, 1989; Kasamo y Yamanishi, 1991).

IV. Efecto de la resina glicosídica sobre la actividad hidrolítica en vesículas purificadas de membrana plasmática.

Al examinar el efecto de la resina glicosídica sobre la actividad de hidrólisis de ATP en las vesículas de membrana plasmática purificadas se observó una inhibición dependiente de la concentración de resina usada (Fig. 11B). El porcentaje de inhibición de la resina fué mayor en esta preparación (25-35%) que el observado en la fracción microsomal (10% a todas las concentraciones examinadas). La explicación de esta aparente discrepancia parece ser el grado de pureza de la preparación, ya que como se mencionó anteriormente, la resina estimula la actividad de las ATPasas de tonoplasto y mitocondrial (y/o fosfatasa ácida). Aunque en la preparación microsomal se intentó aislar la actividad de la ATPasa de membrana plasmática con ayuda de los inhibidores de las otras hidrolasas, es factible que estas enzimas no se inhibieran completamente y contribuyeran con cierta actividad residual. De esta manera el efecto inhibitorio de la resina sobre la ATPasa de membrana plasmática quedó probablemente enmascarado por el efecto estimulatorio de la resina sobre las otras enzimas.

Si se comparan los datos de la inhibición de la resina sobre el crecimiento radicular y la hidrólisis de ATP en vesículas de membrana plasmática, se puede apreciar que una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ la resina inhibe un 87% el crecimiento radicular, mientras que la concentración necesaria para inhibir la hidrólisis de ATP en 25% fue de 133.3 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo, se observó que al aumentar diez

veces la concentración de resina (de 133.3 a 1333.3 $\mu\text{g/ml}$), el porcentaje de inhibición aumentó únicamente 10% (25 y 35% de inhibición, respectivamente). Claramente el porcentaje de inhibición del crecimiento radicular es mayor que la inhibición producida por la resina sobre la actividad de la ATPasa de membrana plasmática. Estos resultados podrían sugerir que el crecimiento radicular es un proceso que requiere de la actividad completa de la ATPasa membranal o bien, que la resina glicosídica inhibe el crecimiento radicular a través de la alteración de funciones no relacionadas con esta enzima, tales como síntesis de proteínas, división celular, respiración, etc.

La resina glicosídica es una mezcla de varios componentes, siendo el mayoritario (85%) la tricolorina A (Pereda-Miranda et al., 1992). El efecto de la tricolorina A sobre la hidrólisis de ATP fue similar al causado por la resina, lo cual demostró que la tricolorina A es el principal constituyente activo de la resina glicosídica y el responsable de la inhibición de la ATPasa de membrana plasmática.

V. Inhibición de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática como un mecanismo de acción involucrado en el efecto inhibitorio de la resina glicosídica sobre el crecimiento radicular.

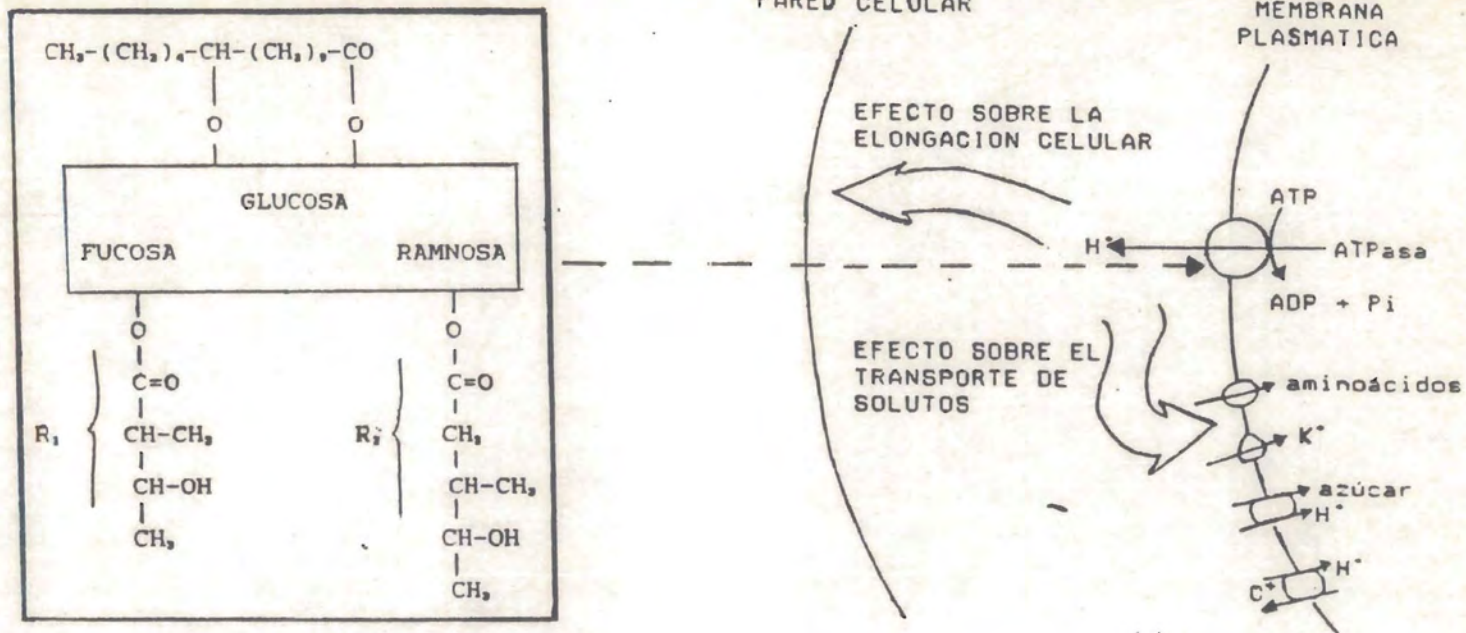
Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran claramente que la resina glicosídica es capaz de inhibir la ATPasa de membrana plasmática de *E. crusgalli*. Esta acción inhibitoria puede resultar de una interacción directa de la resina con algún

sitio de la ATPasa, lo que podría ocurrir en la parte exterior o interior de la célula, ya que la resina es un compuesto altamente hidrofóbico que muy probablemente puede atravesar la membrana plasmática. Como otra alternativa, la inhibición de la ATPasa podría ser el resultado de una alteración en la conformación de la ATPasa producida por una interacción directa con la parte hidrofílica de la enzima ó a través de una inserción de la resina en la zona lipídica circundante a la enzima, ya que la ATPasa requiere de la asociación de lípidos específicos para funcionar de manera óptima (Serrano et al., 1988). El mecanismo de inhibición podría evaluarse a través del estudio del efecto de la resina sobre la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ de la ATPasa, sin embargo estos parámetros cinéticos no se determinaron en el presente trabajo.

La inhibición del crecimiento radicular de *E. crusgalli* producido por la resina glicosídica podría resultar de una alteración de diversos procesos celulares. Aunque en el presente trabajo se demuestra que un sitio de acción es la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, esta inhibición no es completa sino parcial (el efecto máximo es una reducción de 35%). Sin embargo, es posible que una inhibición parcial de esta enzima, cuya actividad es de vital importancia para la fisiología celular, durante períodos prolongados, pueda producir un efecto negativo sobre el crecimiento celular. La importancia de la actividad de esta enzima en la elongación y el crecimiento celular se encuentra ampliamente documentada. Se ha descrito que la ATPasa de H^+ se activa durante

el período de crecimiento de células de tabaco en cultivo (Altabella et al., 1990). Asimismo, fitohormonas capaces de promover el crecimiento celular tales como las auxinas, también producen un incremento en la actividad de la ATPasa de H^+ en diferentes especies vegetales, incluyendo *Pisum sativum* (Gabathuler y Cleland, 1985), *Avena sativa* (Senn y Goldsmith, 1988) y *Nicotiana tabacum* (Altabella et al., 1990). Finalmente, la inhibición de la ATPasa de H^+ por la presencia de vanadato da como resultado una inhibición del crecimiento celular en epicótilos de *Pisum sativum* y coleoptilos de *Avena sativa* (Jacobs y Taiz, 1980).

Con base en los resultados presentados en la Figura 13 se esquematiza el modelo propuesto sobre el mecanismo de acción por medio del cual la resina glicosídica posiblemente ejerce su efecto sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de radícula de *Echinochloa crusgalli*. Suponiendo que la resina glicosídica pueda atravesar la pared celular y posteriormente atravesar ó interactuar con la membrana plasmática (considerando la naturaleza anfipática de esta molécula), la resina provocaría una alteración en la actividad de la enzima y por lo tanto cambios sobre los procesos fisiológicos que dependen de su acción. Esto posiblemente se manifestaría como una inhibición del crecimiento radicular.



NOTA: R_1 y R_2 son sustituyentes intercambiables

FIGURA 13. Modelo de acción de la resina glicosídica sobre la ATPasa de H^+ de membrana plasmática. La enzima presenta diferentes funciones fisiológicas.

Por otra parte, se ha propuesto que algunas resinas glicosídicas, aisladas de *Merremia mammosa*, poseen actividad de ionóforos de cationes, tanto monovalentes (sodio y potasio) como divalentes (calcio), en eritrocitos humanos (Kitagawa et al., 1989). Esta actividad se debe a la lactona macrocíclica que presentan las resinas. Además se ha determinado que la presencia de un residuo glicosilo incrementa su actividad. Considerando que la resina glicosídica de *Ipomoea tricolor* presenta tanto una lactona macrocíclica como una unidad trisacárida (glucosa-fucosa-ramnosa), es probable que pueda actuar también como un ionóforo de cationes. Una alteración en el balance iónico del interior celular, podría ser un mecanismo alternativo o actuar conjuntamente con la inhibición de la ATPasa de H^+ en la inhibición del crecimiento celular. Sin embargo, bajo las condiciones en las que se evaluó la actividad de hidrólisis de ATP en este trabajo, la resina no pudo inhibir a la ATPasa actuando como ionóforo debido a que en el medio de reacción estuvo presente el desacoplante CCCP.

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio se puede decir que uno de los mecanismos de acción por medio del cual la resina glicosídica inhibe el crecimiento radicular posiblemente sea a través de su efecto sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática.

Por último es importante mencionar que este tipo de estudios es necesario para integrar la evaluación de compuestos alelopáticos en el ambiente y para proponer formas de utilización de tales compuestos en el control de malezas.

CONCLUSIONES

1.- La resina glicosídica tuvo un efecto inhibitorio del 10% sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de la radícula de *Echinochloa crusgalli*.

2.- La resina glicosídica mostró dos diferentes comportamientos en la fracción microsomal: uno estimulador y el otro inhibitorio sobre las enzimas que hidrolizan ATP. Los resultados obtenidos con inhibidores de la actividad de hidrólisis de ATP sugirieron que la ATPasa de tonoplasto fue estimulada, la ATPasa mitocondrial y la fosfatasa ácida fueron estimuladas y la ATPasa de membrana plasmática fue inhibida.

3.- El método de partición de fases en dos polímeros permitió el aislamiento de las vesículas de membrana plasmática con un 80% de pureza, la cual fue determinada por inhibidores específicos de la hidrólisis de ATP.

4.- La resina tuvo un efecto inhibitorio del 30% sobre la actividad de la ATPasa de vesículas de membrana plasmática de radícula de *E. crusgalli*.

5.- El compuesto Tricolorina A tuvo un efecto inhibitorio del 37% sobre la actividad de la ATPasa de membrana plasmática de vesículas purificadas de la radícula de *E. crusgalli*.

6.- La acción de la resina glicosídica sobre la ATPasa de membrana

plasmática que se ha demostrado *in vitro* en este trabajo probablemente se da también *in situ* y quizá no sea el único mecanismo a nivel celular por el que este compuesto inhiba el crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alam, S., Kabir, G., Amin, M.N., e Islam M. 1987. Mitotic effect of leaf extracts of *Ipomoea carnea* on *Allium cepa*. *Cytologia* 52:721-724.
- Al-Shawi, M.K., y Senior, A.E. 1992. Effects of dimethyl sulfoxide on catalysis in *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *Biochemistry* 31:886-891.
- Altabella, T., Palazon, J., Ibarz, E., Pinol, T., y Serrano, R. 1990. Effect of auxin concentration and growth phase on the plasma membrane H^+ -ATPase of tobacco calli. *Plant Sci.* 70:209-214.
- Anaya, A.L. 1981. Importancia de la alelopatía dentro de la ecología química. En: Peña, A., Drucker, R.C., y Tapia, R. (Eds.). *Temas selectos de fisiología celular*. UNAM. México. 69-99 pp.
- Anaya, A.L., Calera, M.R., Mata, R., y Pereda-Miranda, R. 1990. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* 16:2145-2152.
- Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., y Wada, Y. 1989. Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21:589-603.
- Balke, N.E. 1985. Effects of allelochemicals on mineral uptake and associated physiological processes. En: Thompson, A.C. (Ed.). *The chemistry of allelopathy*. ACS Symposium Series 268. USA. 161-178 pp.
- Bennet, A.B., O'Neill, S.D., y Spanswick, R.M. 1984. H^+ -ATPase

- activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 74:538-544.
- Bieber, L.W., Da Silva, F.A., Correa, L.R., De Andrade, Ch.A., Carneiro, D.N., De Souza, I.A. De Mélllo, J.F., y Jurgen, V.H. 1986. Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochem.* 25:1077-1081.
- Blum, W., Key, G., Weiler, E.W. 1988. ATPase activity in plasmalemma-rich vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from *Vicia faba* mesophyll and epidermis: characterization and influence of abscisic acid and fusicoccin. *Physiol. Plant.* 72:279-287.
- Bowman, B.J., Mainzer, S.E., Allen, K.E., y Slayman, C.W. 1978. Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatases of *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys Acta* 512:13-28.
- Bowman, B.J., y Bowman, E.J. 1986. H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *J. Membrane Biol.* 94:83-97.
- Bowman, B.J., Dschida, W.J., Harris, T., y Bowman, E.J. 1989. The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa* contains an F₁-like structure. *J. Biol. Chem.* 264:15606-15612.
- Brauer, D., y Tu, S. 1989. Phospholipid requirement of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol.* 89:867-874.
- Brauer, D., y Tu, S. 1991. N-cyclo-N'-(4-dimethylamino- α -naphthyl) carbodiimide inhibits membrane-bound and partially purified

- tonoplast ATPase from maize roots. *Plant Physiol.* 95:707-710.
- Brett, C., y Waldron, K. 1990. The cell wall and control of cell growth. En Black, M. & Chapman, J. (Eds.). *Topics in plant physiol: 2. Physiology and biochemistry of plant cell walls.* Unwin Hyman. UK. 89-113 pp.
- Briskin, D.P., y Reynolds-Niesman, I. 1989. Change in target molecular size of the reed beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.* 90:394-397.
- Calera, M.R. 1989. Potencial alelopático de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). Tesis profesional. Fac. de Ciencias, UNAM. México.
- Cameron, H.J., y Julian, G.R. 1980. Inhibition of protein synthesis in letucce (*Latuca sativa* L.) by allelopathic compounds. *J. Chem. Ecol.* 6:989-995.
- Canut, H., Brightman, A., Boudet, A.M., y Morré, D.J. 1990. Tonoplast vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by preparative free-flow electrophoresis. *Plant Physiol.* 94:1149-1156.
- Cocucci, M.C., y Marrè, E. 1991. Co-sedimentation of one form of plasma membrane H⁺-ATPase and of the fusicoccin receptor from radish microsomes. *Plant Sci.* 73:45-54.
- Coupland, D., Cooke, D.T., y James, C.S. 1991. Effects of 4-chloro-2-methylphenoxypropionate (an auxin analogue) on plasma membrane ATPase activity in herbicide-resistant and herbicide-susceptible biotypes of *Stellaria media* L. *J. Exp. Bot.* 42:1065-1071.

- Cruz O. R., Anaya, A.L., Gavilanes-Ruiz, M., Sánchez Nieto, S., y Jiménez Estrada, M. 1990. Effect of diacetyl piquerol on H⁺-ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*. J. Chem. Ecol. 16:2253-2261.
- De Boer, A.H., Watson, B.A., y Cleland, R.E. 1989. Purification and identification of the fusicoccin binding protein from oat root plasma membrane. Plant Physiol. 89:250-259.
- De Meis, L. 1989. Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds - energy transduction in biological membranes. Biochim. Biophys Acta 979:333-349.
- De Michelis, M.I., Pugliarello, M.C., y Rasi-Caldogno, F. 1989. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H⁺-ATPase. Plant Physiol. 90:133-139.
- Duffus, C.M., y Duffus, J.H. 1984. Carbohydrate metabolism in plants. Longman. UK. 183 pp.
- Dupont, F.M., Burke, L.L., y Spanswick, R.M. 1981. Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction. Plant Physiol. 67:59-63.
- Dupont, F.M., Bennet, A.B., y Spanswick, R.M. 1982. Localization of a proton-translocating ATPase on sucrose gradients. Plant Physiol. 70:1115-1119.
- Einhellig, F.A. y Rasmussen, J.A. 1979. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and growth soybean and grain sorghum seedlings. J. Chem. Ecol. 5:815-824.
- Einhellig, F.A. 1986. Mechanism and modes of action of

- allelochemicals. En: Putnam, A.R., y Tang, Ch-S. (Eds.). The science of allelopathy. John Wiley & Sons. USA. 171-188 pp.
- Ewing, N.N., Wimmers, L.E., Meyer, D.J., Chetelat, R.T., y Bennet, A.B. 1990. Molecular cloning of tomato plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 94:1874-1871.
- Feldwisch, J., Zettl, R., Hesse, F., Schell, J., y Palme, Klaus. 1992. An auxin-binding protein is localized to the plasma membrane of maize coleoptile cells: Identification by photoaffinity labeling and purification of a 23-kDa polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:475-479.
- Forgac, M. 1989. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69:765-796.
- Gabathuler, R., y Cleland, R. 1985. Auxin regulation of a proton translocating ATPase in pea root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 79:1080-1085.
- Gallagher, S.R., y Leonard, R.T. 1982. Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* 70:1335-1340.
- Giannini, J.L., Gildensoph, L.H., y Briskin, D.P. 1987. Selective production of sealed plasma membrane vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 254:621-630.
- González-Romo, P., Sánchez Nieto, S., y Gavilanes-Ruiz, M. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations.

- Anal. Biochem. 200:235-238.
- Hager, A., y Biber, W. 1984. Functional and regulatory properties of H^+ pumps at the tonoplast and plasma membranes of *Zea mays* coleoptiles. Naturforsch. 39c:927-937.
- Harold, F.M. 1986. The vital force: a study of bioenergetics. W.H. Freeman and Company. New York. USA. 577 pp.
- Harper, J.R. y Balke, N.E. 1981. Characterization of the inhibition of K^+ absorption in oat roots by salicylic acid. Plant Physiol. 5:339-342.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y., y Tagawa, K. 1990. Regulatory proteins of F_1F_0 -ATPase: role of ATPase inhibitor. J. Bioenerg. Biomembr. 22:27-38.
- Hennessey, J.P., y Scarborough, G.A. 1988. Secondary structure of the *Neurospora crassa* plasma membrane H^+ -ATPase as estimated by circular dichroism. J. Biol. Chem. 263:3123-3130.
- Hinkle, P.C., y McCarty, R.E. 1988. Cómo fabrican ATP las células. Science 240:58-75.
- Hodges, T.K., y Mills, D. 1986. Isolation of the plasma membrane. En: Packer, L., y Douce, R. (eds.). Methods in enzymology. vol. 118. Academic Press. USA. 41-54 pp.
- Horak, A., y Packer, M. 1985. Coupling factor activity of the purified pea mitochondrial F_1 -ATPase. Biochim. Biophys Acta 810:310-318.
- Horak, A., y Packer, M., y Horak, H. 1989. Reconstitution of oxidative phosphorylation and of oligomycin-sensitive ATPase by five- and six-subunit forms of pea mitochondrial F_1 -ATPase.

Plant Physiol. 91:526-529.

- Howard, F.H., y Peterson, J.K. 1986. Allelopathic effects of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) on yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) and alfalfa (*Medicago sativa*). Weed Sci. 34:623-627.
- Hsu, A.C., Brauer, D., Lu, D., Rodenbach, S., y Tu, S. 1991. Purification and immunological properties of vanadate sensitive Mg:ATPase from plasma membrane of maize roots. Plant Sci. 74:157-166.
- Jacobs, M., y Taiz, L. 1980. Vanadate inhibition of auxin-enhanced H^+ secretion and elongation in pea epicotyls and oat coleoptiles. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7242-7246.
- Jain, A., y Srivastava, H.S. 1981. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. Physiol. Plant. 5:339-342.
- Jankay, P. y Muller, W.H. 1976. The relationship among umbelliferone, growth, and peroxidase levels in cucumber roots. Am. J. Bot. 63:126-132.
- Kaestner, K., Randall, S.T., y Sze, H. 1988. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of the vacuolar H^+ -ATPase from oat roots. J. Biol. Chem. 263:1282-1287.
- Kane, P.M., Yamashiro, C.T., y Stevens, T.H. 1989. Biochemical characterization of the yeast vacuolar H^+ -ATPase. J. Biochem. Chem. 264:19236-19244.
- Kasamo, K. 1988. Response of tonoplast and plasma membrane ATPase in chilling-sensitive and -insensitive rice (*Oryza sativa* L.)

culture cells to low temperature. *Plant Cell Physiol.* 29:1085-1094.

Kasamo, K., Yamanishi, H., Kagita, F., y Saji, H. 1991. Reconstitution of tonoplast H⁺-ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls in liposomes. *Plant Cell Physiol.* 32:643-651.

Kasamo, K., y Yamanishi, H. 1991. Functional reconstitution of plasma membrane H⁺-ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls in liposomes prepared with various molecular species of phospholipids. *Plant Cell Physiol.* 32:1219-1225.

Kitagawa, I., Ohashi, K., Kawanishi, H., Shibuya, H., Shinkai, K., y Akedo, H. 1989. Ionophoretic activities of oligopeptide lactones and resin-glycosides in human erythrocytes. *Chem. Pharm. Bull.* 37:1679-1681.

Koepe, D.E. 1972. Some reactions of isolated corn mitochondria influenced by juglone. *Physiol. Plant.* 27:89-94.

Kolarov, J., Kulpa, J., Baijot, M., y Goffeau, A. 1988. Characterization of a protein serine kinase from yeast plasma membrane. 263:10613-10619.

Ladyzhenskaya, E.P., Adam, A., Korableva, N.P., y Ersek, T. 1991. Plasmalemma-bound ATPase of potato tubers and its inhibition by *Phytophthora infestans*-derived elicitors of the hypersensitive reaction. *Plant Sci.* 73:137-142.

Larson, Ch., Widell, S., y Kjellbom, P. 1987. Preparation of high-purity plasma membranes. En: Packer, L. y Douce, R. (eds.). *Methods in enzymology.* vol. 148. Academic Press. USA. 558-568

pp.

- Leather, G.R., y Einhellig, F.A. 1988. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *J. Chem. Ecol.* 14:1821-1827.
- Luckner, M. 1991. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer-Verlag. Berlín. 543 pp.
- Maeshima, M. 1990. Development of vacuolar membranes during elongation of cells in mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 31:311-317.
- Malhotra, S.K. 1983. The plasma membrane. John Wiley & Sons. New York, USA. 209 pp.
- Maloney, P.C., y Ambudkar, S.V. 1989 Functional reconstitution prokaryote and eukaryote membrane proteins. *Archiv. Biochem. Biophys* 269:1-10.
- Mandala, S., Mettler, I.J., y Taiz, L. 1982. Localization of the proton pump of corn coleoptile microsomal membranes by density gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 70:1743-1747.
- Mandala, S., y Taiz, L. 1986. Characterization of the subunit structure of the maize tonoplast ATPase. *J. Biol. Chem.* 261:12850-12855.
- Mandava, N.R. 1985. Handbook of natural pesticides: Methods. Vol. 5. CRC Press. Florida, USA. 524 pp.
- Mann, J. 1987. Secondary metabolism. 2a ed. Clarendon Press. New York, USA. 374 pp.
- Matsuura-Endo, Ch., Maeshima, M., y Yoshida, S. 1990. Subunit composition of vacuolar membrane H⁺-ATPase from mung bean.

- Eur. J. Biochem. 187:745-751.
- Nelson, N., y Taiz, L. 1989. The evolution of H⁺-ATPases. Trends Biochem. Sci. 14:113-116.
- O'Neill, S.D., y Spanswick, R.M. 1984. Solubilization and reconstitution of a vanadate-sensitive H⁺-ATPase from the plasma membrane of *Beta vulgaris*. J. Membrane Biol. 79:231-243.
- Palmgren, M.G. 1990. An H⁺-ATPase assay: proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. Plant Physiol. 94:882-886.
- Passam, H.C., y Palmer, J.M. 1973. The ATPase activity of jerusalem artichoke mitochondria and submitochondrial particles. Biochim. Biophys Acta 305:80-87.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A.L., Mahinda Wickramaratne, D.B., Pezzuto, J.M., y Kinghorn, A.D. 1992. Tricolorina A, major phyto-growth-inhibitor from *Ipomoea tricolor*. J. Nat. Prod. (en prensa).
- Peterson, G.L. 1977. Simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83:346-356.
- Peterson, J.K., y Howard, F.H. 1991. Isolation of substance from sweet potato (*Ipomoea batatas*) periderm tissue that inhibits seed germination. J. Chem. Ecol. 17:943-951.
- Portillo, F., De Larrinoa, I.F., y Serrano, R. 1989. Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. FEBS Lett.

247:381-385.

- Pugin, A., Magnin, T., y Gaudemer, Y. 1991. Properties of the tonoplast ATP-dependent H^+ pump of *Acer pseudoplatanus*: inhibition by nitrate and vanadate. *Plant Sci.* 73:23-34.
- Putnam, A.R. 1985. Allelopathic research in agriculture: past highlights and potential. En: Thompson, A.C. (Ed.). *The chemistry of allelopathy.* ACS Symposium Series 268. USA. 1-8 pp.
- Putnam, A.R., y Tang, Ch-S. 1986. Allelopathy: state of the science. En: Putnam, A.R. y Tang, Ch-S. (Eds.). *The science of allelopathy.* John Wiley & Sons. USA. 1-22 pp.
- Rice, E.L. 1979. *Allelopathy.* 1a ed. Academic Press. New York, USA. 353 pp.
- Rice, E.L. 1984. *Allelopathy.* 2a ed. Academic Press. New York, USA. 422 pp.
- Sandberg, G., Crozier, A., y Ernstsén, A. 1987. Indole-3-acetic acid and related compounds. En: Rivier, L., y Crozier, A. (Eds.). *Principles and practice of plant hormone analysis vol. 2.* Academic Press. USA. 169-301 pp.
- Sanders, D. 1990. Kinetic modeling of plant and fungal membrane transport systems. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41:77-107.
- Sandstrom, R.P., DeBoer, A.H., Lomax, T.L., y Cleland, R.E. 1987. Latency of plasma membrane H^+ -ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning. *Plant Physiol.* 85:693-698.
- Sandstrom, R.P., y Cleland, R.E. 1989. Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. 90:1524-1531.

- Santoni, V., Vansuyt, G., y Rossignol, M. 1990. Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane H⁺-ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.* 68:33-38.
- Sarin, J.P., Garg, H.S., Khanna, N.M., y Dhar, M.N. 1973. Ipolearoside: a new Glycoside from *Ipomoea leari* with anti-cancer activity. *Phytochem.* 12:2461-2468.
- Sato, T., Kiuchi, F., y Sankawa, U. 1982. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochem.* 21:845-850.
- Schultes, R.E. 1982. Plantas alucinógenas. La Prensa Médica Mexicana. México. 160 pp.
- Seigler, D., y Price, W.P. 1976. Secondary compounds in plants: primary functions. *Amer. Natur.* 110:101-105.
- Senn, A.P., y Goldsmith, M.H. 1988. Regulation of electrogenic proton pumping by auxin and fusicoccin as related to the growth of *Avena coleoptiles*. *Plant Physiol.* 88:131-138.
- Serrano, R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys Acta* 947: 1-28.
- Serrano, R., Montesinos, C., y Sánchez, J. 1988. Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Sci.* 56:117-122.
- Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40:61-94.
- Serrano, R. 1990. Plasma membrane ATPase. En: Larson, C., y Moller, I.M. (Eds.). *The plant plasma membrane.* Springer-Verlag.

Berlin. 127-153 pp.

Shimazaki, K., y Kondo, N. 1987. Plasma membrane H⁺-ATPase in guard-cell protoplasts from *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.* 28:893-900.

Shiraishi, T., Araki, M., Yoshioka, H., Kobayashi, I., Yamada, T., Ichinose, Y., Kunoh, H., y Oku, H. 1991. Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes in situ by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 32:1067-1075.

Singhvi, N.R., y Sharma, K.D. 1984. Allelopathic effects of *Ludwigia adscendens* Linn. and *Ipomoea aquatica* Forsk on seedling growth of pearl millet (*Pennisetum typhoideum* Rich.). *Trans. Isdt & Ucds.* 9:95-100.

Smith, R., y Scarborough, G.A. 1984. Large-scale isolation and purification of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. *Anal. Biochem.* 138:156-163.

Suttle, J.C., y Kende, H. 1980. Ethylene action and loss of membrane integrity during petal senescence in *Tradescantia*. *Plant Physiol.* 65:1067-1072.

Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:479-501.

Taiz, S.L., y Taiz, L. 1991. Ultrastructural comparison of the vacuolar and mitochondrial H⁺-ATPases of *Daucus carota*. *Bot. Acta* 104:117-121.

Trease, G.E. y Evans, W.Ch. 1982. *Farmacognosia*. CECSA. España. 910 pp.

- Tukey, H.B. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *The Bot. Rev.* 35:1-16.
- Uchida, E., Ohsumi, Y., y Anraku, Y. 1988. Characterization and function of catalytic subunit a of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263:45-51.
- Ullah, A.H., y Gibson, D.M. 1988. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem, Biophys* 260:514-520.
- Vara, F., y Serrano, R. 1983. Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 258:5334-5336.
- Wach, A., Ahlers, J., y Graber, P. 1990. The H⁺-ATPase of the plasma membrane from yeast. *Eur. J. Biochem.* 189:675-682.
- Wacker, T.L., Safir, G.R., y Stephens, Ch.T. 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *J. Chem. Ecol.* 16:901-909.
- Whittaker, R.H. y Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* 171:757-770.
- Yanagita, Y., Abdel-Ghany, M., Raden, D., Nelson, N., y Racker, E. 1987. Polypeptide-dependent protein kinase from bakers' yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:925-929.
- Yoshida, K., y Takeuchi, Y. 1970. Properties of a soluble ATPase from castor bean endosperm mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 11:403-409.

Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y., y Oku, H.
1990. Suppression of pisatin production and ATPase activity in
pea plasma membranes by orthovanadate, verapamil and a
suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiol.
31:1139-1146.