

318877



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL EFECTO DEL ESTRÉS ALELOQUÍMICO Y EL ESTRÉS HÍDRICO EN LAS RAÍCES DE *LYCOPERSICON ESCULENTUM* L. (SOLANACEAE)



BIBLIOTECA INSTITUTO DE ECOLOGIA UNAM

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. MARÍA TERESA ROMERO ROMERO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2003



COORDINACIÓN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de marzo de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Romero Romero María Teresa**, con número de cuenta 86295361, y número de expediente 0, con la tesis titulada: "**Estudio comparativo entre el efecto del estrés aleloquímico y el estrés hídrico en raíces de *Lycopersicon esculentum* L. (Solanaceae)**", bajo la dirección de la **Dra. María del Rocío Cruz Ortega**.

Presidente:	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Vocal:	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Secretario:	Dra. María del Rocío Cruz Ortega
Suplente:	Dra. Alma Delfina Orozco Segovia
Suplente:	Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de mayo de 2003

  
Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas que estuvieron apoyándome en este trabajo de investigación y, sin que se confunda con feminismo, quiero expresar mi admiración a las grandes doctoras e investigadoras que forman parte de esta gran casa de estudios que es la UNAM; porque además de ser investigadoras cumplen importantes papeles en la familia y en la sociedad.

Gracias a los apoyos económicos recibidos por parte del programa de becas para estudios de posgrado CONACYT (158323) que contribuyeron a mi formación durante la maestría.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega, por el gran apoyo y dedicación que destinó a este trabajo día a día, por compartir todo su conocimiento, por sus asesorías, por resolverme cualquier duda, por estar conmigo siempre que la necesito, por depositar su confianza en mi y por ser una gran persona y amiga y por muchas cosas mas .....**gracias** Dra. Rocío.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang **por ser como es**, por todo el apoyo otorgado en mi formación como estudiante, por las acertadas sugerencias al trabajo y por permitirme colaborar en su línea de investigación.

A la Dra. Alma Orozco Segovia mis más sinceros agradecimientos por todo el tiempo que me brindó, por su apoyo incondicional y por las sugerencias hechas al trabajo de investigación.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por las asesorías y tiempo que me otorgó durante el trabajo de experimentación, porque siempre estuvo dispuesta a responder mis dudas y por la revisión del trabajo, además por brindarme su valiosa amistad.

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra por la participación muy acertada que tuvo en el trabajo de experimentación y por las sugerencias hechas sobre el mismo que abrieron líneas para futuras investigaciones.

A la Q. A. Blanca Estela Hernández Bautista porque además de ser una gran compañera de trabajo que estimo mucho, brinda su apoyo profesional y personal en cualquier momento a cada uno de los integrantes del laboratorio (incluyéndome).



*Esta tesis la dedico con mucho cariño a mis padres: Teresa y Fernando, a mi hermano: Carlos Fernando, a mi novio: Ramón, a mis abuelitos y abuelitas, a mis tías: Blanca, Socorro, Patricia, Alejandra, Rosa, Cecilia, Araceli, a mis tíos: Manuel, Rubén, José, Albino, a mis primos, a mis sobrinos, que los amo tanto.....*

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	4
ESTRÉS EN PLANTAS .....	5
ESTRÉS ALELOQUÍMICO .....	6
CONCEPTO DE ALELOPATÍA.....	6
BIOSÍNTESIS Y NATURALEZA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS: .....	7
MODOS DE LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS.....	7
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS .....	7
ESTRÉS HÍDRICO .....	12
ABSORCIÓN DE AGUA POR LAS PLANTAS .....	12
ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS AL DÉFICIT HÍDRICO.....	13
EL ÁCIDO ABSCISICO .....	13
EJEMPLOS DE GENES EXPRESADOS DURANTE PERIODOS DE ESTRÉS HÍDRICO.....	14
PROTEINAS LEA.....	15
OSMORREGULACIÓN.....	17
ESTRÉS OXIDATIVO.....	18
ATPASA DE H <sup>+</sup> DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS VEGETALES .....	21
ATPASA DE H <sup>+</sup> DE TONOPLASTO .....	24
CATALASA .....	26
<i>Sicyos deppei</i> G. DON .....	28
<i>Lycopersicon esculentum</i> L. MILL.....	30
ANTECEDENTES.....	32
HIPOTESIS .....	33
OBJETIVO GENERAL: .....	33
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	34
MATERIALES Y METODOS .....	35
MATERIAL BIOLÓGICO Y ESTRÉS ALELOQUÍMICO .....	35
BIOENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	35

ESTRÉS HÍDRICO .....	36
OBSERVACIONES EN MICROSCOPIA DE BARRIDO Y ELECTRÓNICA.....	37
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ATPASAS DE H <sup>+</sup> .....	38
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA POR GELES DE ACTIVIDAD .....	40
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	41
MEDICIÓN DE RADICALES LIBRES POR QUIMIOLUMINISCENCIA .....	42
MEDICIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN .....	43
EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS LEA .....	44
EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL Y NORTHERN BLOTS.....	45
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PLE4 Y PLE25 POR NORTHERN BLOTS. .....	47
RESULTADOS .....	49
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68

## Abreviaturas

ATP.	Adenosin 5' trifosfato
BRIJ.	Polioxietileno 20 cetil éter
BTP.	1,3-bis [tris (hidroximetilamino) propano]
CCCP.	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazono
DTT.	Ditiotreitol
DEPC.	Dietil pirocarbonato
EDTA.	Ácido etilenodiamino tetraácetico
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina N'-2-ácido etanolsulfónico
MOPS.	(3-[N-morfolino] ácido propanosulfónico )
SDS.	Sodio dodecil sulfato
Tween 20.	Polioxietilenosorbitan monolaurato

## RESUMEN

En este trabajo se compararon los efectos entre el estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei* (0.5%, -0.028 MPa) y el estrés hídrico (PEG 8000 12%, -0.328MPa) sobre parámetros morfológicos y funcionales de la raíz de *Lycopersicon esculentum*. Se estudió la morfología de la raíz, la actividad de las ATPasas de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y del tonoplasto, la actividad de la catalasa, la lipoperoxidación, la producción de radicales libres y la expresión de los genes de dos proteínas LEA (pLE4 y pLE25). Tanto el estrés aleloquímico como el estrés hídrico inhibieron el 80% el crecimiento de la raíz del jitomate. La microscopia de barrido de las raíces tratadas, mostró un engrosamiento en la zona meristemática y en la de elongación. Las raíces con estrés aleloquímico presentaron abundancia de pelos radiculares, lo que no se observó con el estrés hídrico. Observaciones en microscopía de transmisión mostraron que las células de la periferia de las raíces de los dos tratamientos, presentaron plasmólisis, siendo más evidente en las raíces expuestas al lixiviado de *S. deppei*. La actividad de las ATPasas de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y del tonoplasto de la raíz fue significativamente inhibida, 50% y 28% por el estrés aleloquímico y 56% y 42% por el estrés hídrico. La actividad de la catalasa aumentó significativamente 40% con el estrés aleloquímico y 81% con el estrés hídrico. La lipoperoxidación en las células de las raíces con estrés aleloquímico aumentó 47% y con estrés hídrico 105%. Los radicales libres aumentaron 40% con estrés aleloquímico y disminuyeron 68% con el estrés hídrico. El análisis de la expresión de los genes pLE4 y pLE25 por Northern blot de las raíces de jitomate no mostró niveles detectables de los transcritos. Los resultados obtenidos indican que aun cuando se observan respuestas comunes con ambos tipos de estrés, éstas varían en magnitud y, probablemente, también en tiempo lo que sugiere la participación de distintas vías de señalización.

# INTRODUCCIÓN

## ESTRÉS EN PLANTAS

Las plantas están frecuentemente expuestas a diferentes factores de estrés que pueden interferir con su crecimiento normal y su desarrollo. Los factores de estrés pueden ser abióticos, como la sequía, inundaciones, salinidad, frío, calor, radiaciones, viento, suelos ácidos u alcalinos, altas concentraciones o deficiencia de minerales; y/o bióticos, como los patógenos, herbívoros, aleloquímicos, densidad poblacional y contaminación por el hombre (Larcher, 1995). Las plantas para adaptarse a las variantes condiciones del medio han desarrollado mecanismos para percibir los parámetros ambientales, y así poder responder ante ellos. Por esta razón cualquier factor de estrés puede dar origen a un complejo número de respuestas que comienzan con la percepción del mismo, seguido de las rutas de transducción de señales, que se van a manifestar en cambios a nivel celular, fisiológico y, consecuentemente, en el desarrollo de la planta. Esta serie de respuestas también van a depender de la severidad y duración del estrés, de la especie y genotipo de la planta, de su estado de desarrollo, del órgano vegetal y del tipo celular (Bray, 1993, 1997). En las plantas cultivadas estos factores de estrés reducen la calidad del alimento y su producción (Sachs, 1986; Iturbe-Ormaetxe, 1998).

A través del tiempo, las plantas pueden desarrollar lo que se denomina aclimatación a un cierto factor de estrés (proceso de adaptación por el cual las plantas pueden sobrevivir frente a él). Esta aclimatación tiene bases genéticas y está mediada por el ambiente. Desafortunadamente, no todas las plantas tienen éxito al tratar de sobrevivir, generalmente porque no cuentan con los mecanismos moleculares (carga genética) para evadir o tolerar el estrés (Lambers, et. al. 1998).

Una de las respuestas de las plantas a los factores de estrés es la síntesis de proteínas como las LEA, término que se refiere a proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant Proteins, por sus siglas en inglés), las cuales se expresan bajo condiciones de estrés hídrico u osmótico. Se ha

sugerido que la función de las LEA es proteger a las estructuras celulares de la desecación (Bray, 2000). Otra clase de proteínas son las sintetizadas durante el estrés térmico (HSPs) las cuales tienen la función de proporcionar termotolerancia a las plantas, por medio de su actividad como chaperonas (proteínas que ayudan al plegamiento de otras proteínas) dentro de las células como la HSP 104 y 90 (Vierling, 1991). Se pueden citar también a las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), como las quitinasas y glucanasas que degradan los polisacáridos de la pared celular de los hongos y reducen el crecimiento de éstos (Abad, et. al. 1996). Además, hay otras proteínas que participan en el metabolismo general y cuya expresión aumenta durante los períodos de estrés.

## **ESTRÉS ALELOQUÍMICO**

### **CONCEPTO DE ALELOPATÍA.**

La alelopatía puede ser considerada dentro de los factores bióticos que pueden causar un estrés y afectar el crecimiento de las plantas. Este fenómeno es sumamente complejo y se refiere a la producción de metabolitos secundarios por una planta o un microorganismo, los cuales pueden tener un efecto benéfico o perjudicial sobre otro organismo. Actualmente, la alelopatía se define como cualquier proceso que involucra metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos, los cuales influyen en el crecimiento y desarrollo de los sistemas biológicos (IAS, 1996). Los metabolitos secundarios que intervienen como mediadores en una relación química entre organismos de diferente especie se denominan aleloquímicos.

En el proceso de la alelopatía están involucrados varios componentes: (1) la planta productora de los aleloquímicos-metabolitos, (2) las condiciones ambientales y biológicas del suelo, y (3) la planta receptora de los aleloquímicos, entre otros.

## **BIOSÍNTESIS Y NATURALEZA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS:**

Los metabolitos secundarios implicados en la alelopatía, pertenecen a diversos grupos químicos; pero la mayoría de ellos provienen de la vía del acetato o del ácido shikímico. Los grupos principales son: terpenoides, quinonas, cumarinas, taninos, flavonoides y ácido cinámico (Einhellig, 2002).

## **MODOS DE LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS**

De acuerdo con Rice (1984) existen cuatro rutas de liberación de los aleloquímicos al medio: las cuales son: volatilización, lixiviación, exudación por las raíces y descomposición de los residuos de la planta. Estas rutas de liberación dependen de la naturaleza química de los compuestos, del sitio de almacenamiento de los mismos dentro de las células y tejidos, y de su asociación con otras moléculas (Gershenson, 1993). Por otra parte, la síntesis, la liberación y la toxicidad de los aleloquímicos también están influenciadas por varios factores abióticos como son: la luz, las altas temperaturas, la humedad (Einhellig, 1987), y por las características físicas y químicas del suelo, como la textura, aireación y pH (Berg, 1986). Los aleloquímicos pueden ser tóxicos para la misma planta que los produce, por lo que éstas han desarrollado diversos mecanismos o estrategias para mantenerlos alejados de los sitios donde se efectúan reacciones metabólicas. Por ejemplo, las plantas los pueden inactivar combinándolos con azúcares y/o formando polímeros; también pueden ser almacenados en las vacuolas, depositados en células muertas (duramen de la madera), en espacios intercelulares, en pelos glandulares, o bien, ser liberados al exterior (Rice, 1984).

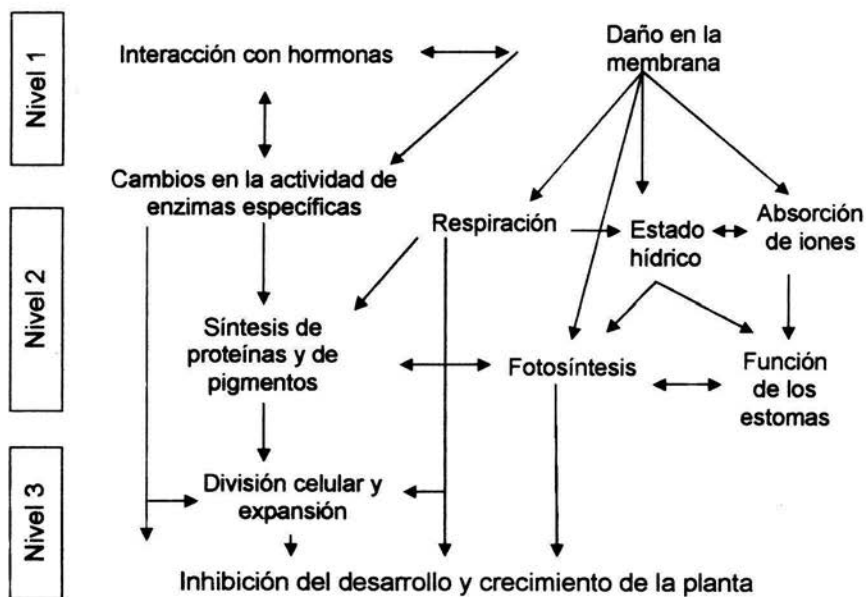
## **MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS**

En muchos estudios se ha demostrado el efecto de los aleloquímicos sobre el crecimiento y/o desarrollo de la planta receptora. Sin embargo, el modo de acción fisiológico de muchos de ellos es desconocido, así como los mecanismos



moleculares involucrados y las respuestas fisiológicas que desencadenan en las células de las plantas receptoras.

El estudio de los mecanismos de acción de los compuestos aleloquímicos es complejo debido a la diversidad de blancos moleculares en la planta receptora. Por ejemplo, Einhellig (1995) ha propuesto que el modo de acción de los compuestos fenólicos es múltiple (figura 1) y que su acción sobre las membranas es la causa principal de la alteración de procesos como la función normal de las ATPasas de H<sup>+</sup>, canales, acarreadores y vías de señalamiento.



**Figura 1.** Secuencia hipotética de los diferentes mecanismos de acción que los compuestos fenólicos pueden tener en las plantas receptoras. Las flechas indican un efecto negativo sobre los procesos celulares (tomado de Einhellig, 1986).

La mayoría de las investigaciones sobre los mecanismos de acción de los aleloquímicos se ha enfocado al estudio de procesos celulares específicos, entre los más importantes tenemos:

**CRECIMIENTO Y DIVISION CELULAR.** Muchos aleloquímicos tienen efectos sobre el crecimiento de varias especies de malezas y cultivos, al causar una inhibición de la germinación, del crecimiento de las raíces y de los brotes, además de ocasionar una disminución en la expansión foliar (Einhellig, 1995). Flores-Carmona (2003) estudió el efecto de lixiviados acuosos (1%) de *Pedilantus tithymaloides* y *Heliocarpus sp.* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli* y observó que ambas causaron una inhibición de más de 60% en las dos especies de prueba. La inhibición del crecimiento radicular puede originarse, entre otros procesos, por la alteración o inhibición de la división celular. Cruz-Ortega y colaboradores (1988) observaron que el extracto etanólico del polen de maíz actúa como un inhibidor de la mitosis en células meristemáticas de raíces de sandía, inhibiendo el índice mitótico un 50%. Por otra parte, Anaya y Pelayo-Benavides (1997) observaron que el lixiviado acuoso de *Mirabilis jalapa* inhibió un 31% la mitosis en el meristemo de raíces de chícharo.

**INTERACCIÓN CON HORMONAS.** Algunos aleloquímicos pueden alterar los niveles de ciertas hormonas en células o tejidos vegetales, por ejemplo: las plántulas de avena y chícharo tratadas con ácido ferúlico presentaron una disminución en la concentración del ácido indolacético (IAA) debido a la inhibición de la enzima IAA-oxidasa, la cual actúa directamente sobre el precursor del IAA (Tayal y Sharma, 1985 citado en Devi, et. al. 1996b). Los compuestos fenólicos, pueden interactuar además, con el ácido giberélico (GA), ya sea uniéndose a la molécula o inhibiendo su proceso de síntesis. Rasmussen y Einhellig (1979) observaron una inhibición de la germinación inducida por ácido giberélico en semillas de *Shorgum sp* tratadas con los ácidos ferúlico, p-cumárico y vainílico. Los taninos inhiben el crecimiento inducido por el GA, a través de la inhibición de la síntesis de la amilasa y de la fosfatasa en el endospermo de las semillas de cebada (Jacobsen y Corcoran, 1977). Por otro lado, la inhibición del crecimiento del pepino por el al ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos, ha sido relacionada con el aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA) (Holappa y Blum, 1991; Li, et. al. 1993).

**ENZIMAS.** Muchos de los aleloquímicos pueden modificar la actividad de varias enzimas, tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibiendo su actividad a altas concentraciones y estimulándola a bajas. El ácido ferúlico aplicado a plántulas de maíz (0.5 - 3.0 mM) estimula la actividad de algunas enzimas oxidativas como las peroxidasas, las catalasas y la IAA-oxidasa, e inhibe la actividad de la polifenol oxidasa; por otro lado, estimula la actividad de las enzimas de la síntesis de los fenilpropanoides, la fenilalanina-amoniolasa (PAL) y la cinamilalcohol-deshidrogenasa (Devi y Prasad, 1996a). En raíces de soya (*Glycine max*) se observó una estimulación en la actividad de la peroxidasa por acción de los ácidos ferúlico y vainílico (1 mM) (Herrig, et. al. 2002).

**RESPIRACIÓN.** Algunos aleloquímicos son capaces de inhibir o alterar la respiración, dependiendo de su naturaleza química, de su concentración y de la edad de la planta receptora. Cruz-Ortega y colaboradores (1988) observaron que el extracto etanólico del polen de maíz actuó como un inhibidor del transporte de electrones, disminuyendo el consumo de oxígeno en mitocondrias de sandía. En otro estudio, Abraham y colaboradores (2000) observaron que el  $\alpha$ -pineno, a concentraciones  $>1.0$  mM, inhibió la respiración en mitocondrias aisladas de raíz de *Zea mays*, y a una concentración  $< 1.0$  mM la estimuló. Mucciarelli y col. (2001) observaron que la (+)-pulegona, extraída de un aceite esencial de *Mentha piperita*, inhibió 50% la respiración de la raíz de *Cucumis sativus* y el transporte de electrones en mitocondrias aisladas.

**FOTOSÍNTESIS.** La inhibición del crecimiento y la disminución en el peso seco, debidas al efecto del estrés aleloquímico, pueden estar relacionadas con un efecto sobre el proceso de fotosíntesis. Calera y colaboradores (1995a, 1996) observaron en cloroplastos de espinacas, que la isoalloalantolactona, aislada de *Ratibida mexicana*, inhibió la síntesis de ATP, alterando el flujo de protones y el transporte de electrones en el fotosistema II (P680). El efecto de los aleloquímicos sobre el proceso de la fotosíntesis, es un aspecto importante a considerar debido al potencial herbicida que algunos aleloquímicos pueden tener (Devi, et. al. 1996b).

**RELACIONES HIDRICAS.** La absorción del agua, esencial para mantener la turgencia en las células, es también afectada por un gran número de aleloquímicos. Se ha demostrado que en plantas de soya, pepino, jitomate y sorgo, el potencial hídrico de las hojas disminuye por efecto de los ácidos ferúlico, p-cumárico, gálico y por la cafeína (Blum y Dalton, 1985). Sin embargo, Klein y Blum (1990) no observaron ningún cambio en el potencial hídrico del frijol, lo que sugiere que existe una diferencia en sensibilidad en las plantas a los aleloquímicos. Einhellig y colaboradores (1985) sugirieron que la inhibición de la conductancia estomatal, de la transpiración y de la expansión de las hojas, causada por varios aleloquímicos, se debe a la reducción del potencial hídrico.

**PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA.** Los compuestos fenólicos, como el flavonol y los flavonoides, pueden alterar las propiedades de la membrana causando una despolarización e interfiriendo con la actividad de las ATPasas, lo que causa un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa, que provee la energía necesaria para las funciones celulares (Moreland y Novitzky, 1987). El diacetil-piquerol (derivado del piquerol, aislado de *Piqueria trinervia*) inhibió la actividad de la ATPasa H<sup>+</sup> en microsomas de células de raíces de *Ipomoea purpurea*. La ATPasa H<sup>+</sup> de la membrana plasmática fue inhibida 67.2% y la del tonoplasto 31.6% (Cruz-Ortega, et. al. 1990). En otro estudio, se observó que la resina glucosídica de *Ipomoea tricolor* inhibió 30% la actividad de la ATPasa H<sup>+</sup> de membrana plasmática en raíces de *Echinochloa crus-galli* (Calera, et. al. 1995b). Así, la interferencia de aleloquímicos con la síntesis de ATP, o su disponibilidad para varios procesos de transporte puede alterar las funciones de la membrana y, por lo tanto, el metabolismo de la planta.

**ABSORCIÓN DE NUTRIMENTOS.** Los aleloquímicos pueden interferir con la absorción de nutrientes por la planta. Abenavoli y colaboradores (2001) observaron que el ácido cumárico inhibió la absorción del nitrato así como el crecimiento radicular y la respiración en raíces de trigo.

**SINTESIS DE PROTEÍNAS.** Romero y colaboradores (2002) reportaron que los lixiviados acuosos (1%) de *Sicyos deppei*, *Acacia sedillense*, *Lantana camara* y *Sebastiania adenophora* alteraron los patrones de síntesis de proteínas citoplásmicas de raíces de *Zea mays*, *Cucurbita pepo*, *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicon esculentum*, aumentando, disminuyendo, o inhibiendo proteínas de bajo, mediano y alto peso molecular. En otro estudio, Baziramakenga y col. (1997) observaron, en raíces de plántulas de soya (*Glycine max*), que los ácidos benzoico, vainílico, cinámico y ferúlico, a 250  $\mu\text{M}$ , disminuyeron la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a los ácidos nucleicos, así como también la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -metionina a las proteínas, y por el contrario, los ácidos p-hidroxibenzoico y p-cumárico aumentaron su incorporación. A una concentración de 125  $\mu\text{M}$  la mayoría de estos compuestos, excepto los ácidos benzoico y cinámico, aumentaron la incorporación de  $^{32}\text{P}$  al DNA y al RNA, y los ácidos vainílico, cinámico y ferúlico disminuyeron la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -metionina a las proteínas. Los autores concluyeron que la interferencia de los ácidos fenólicos con los ácidos nucleicos y el metabolismo de las proteínas, es uno de los muchos mecanismos por los cuales éstos pueden afectar el crecimiento de las plántulas de soya.

## **ESTRÉS HÍDRICO**

En las plantas, el agua constituye de 85 a 95% de la masa total, por lo que al reducirse el porcentaje por debajo de estos niveles, se ocasiona un estrés hídrico en la célula vegetal, alterando diversos procesos bioquímicos y fisiológicos (Taiz y Zeiger 2002).

## **ABSORCIÓN DE AGUA POR LAS PLANTAS**

Las plantas son capaces de absorber agua del suelo gracias al flujo que se establece en el sistema suelo-planta-atmósfera. En este sistema, el agua se mueve debido a diferencias en su estado termodinámico; el agua, independientemente de su estado físico, posee energía y parte de esa energía puede ser utilizada para su movimiento

en el suelo, en la planta o en la atmósfera. El estado de energía del agua, que es una medida de su energía potencial, se denomina potencial hídrico ( $\psi_a$ ), el cual está definido por la energía libre de Gibbs. Puesto que el agua se difunde de mayor a menor concentración, las plantas solo podrán absorber agua cuando su energía potencial sea menor en las raíces que en el suelo ( $\psi_a$  más negativo), y por lo tanto el movimiento del agua en la planta dependerá de un gradiente del potencial hídrico a lo largo de ella (Buchanan, et. al. 2000).

#### **ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS AL DÉFICIT HÍDRICO**

Las plantas que crecen en el desierto o en condiciones de baja disponibilidad de agua, presentan mecanismos de adaptación, ya sean de tipo fenológico, morfológico y/o fisiológico-bioquímicos, que les permiten tolerar en mayor o en menor grado los efectos perjudiciales provocados por la falta de agua (Santos y Ochoa, 1990). Entre los mecanismos de adaptación fisiológico-bioquímicos están la osmorregulación y la expresión *de novo* de genes (dependientes o no del ácido abscísico) como se explica a continuación.

#### **EL ÁCIDO ABSCÍSICO**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que tiene muchas funciones importantes en la fisiología y ciclo de vida de la planta, principalmente en el desarrollo de la semilla, y además está relacionada con la respuesta al estrés hídrico. Esta hormona se ha caracterizado porque su concentración aumenta bajo condiciones de déficit hídrico, salinidad y frío, ocasionando el cierre de los estomas, y disminuir así la tasa de transpiración para que la planta no pierda agua durante el estrés osmótico (Jia y Zhang, 2000). Se ha visto que la acumulación del ABA origina cascadas de transducción de señales intracelulares y la activación de genes. El ABA induce la expresión de sólo algunos tipos de genes en el estrés hídrico, y se ha propuesto que para ello existen dos rutas: En la primera, los genes no requieren de la biosíntesis de factores de transcripción para su expresión; el DNA de estos genes

se distingue por una secuencia en sus regiones promotoras de elementos de respuesta al ácido abscísico (ABRE) 5'-C/TACGTGGC-3' que son reconocidos por el factor EmBP-1 (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). La segunda ruta sí requiere de la biosíntesis de factores proteínicos para la expresión de los genes (como son los factores MYC, MYB y bZIP). Por otra parte, se ha visto que hay genes que se encienden durante el estrés hídrico, los cuales no son inducidos por el ABA, estos genes contienen una secuencia consenso 5'-TACCGACAT-3', que se conoce como elemento DRE (elementos de respuesta a la sequía) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996 y 1997).

#### **EJEMPLOS DE GENES EXPRESADOS DURANTE PERIODOS DE ESTRÉS HÍDRICO:**

Cuando el citoplasma de la célula pierde turgencia, se inician procesos de regulación para ajustar el metabolismo celular a las nuevas condiciones ambientales, y esto da como resultado cambios en la expresión de los genes. Los productos de estos genes expresados durante el estrés hídrico se han clasificado en dos grupos: 1) proteínas que dan tolerancia al estrés, implicadas en los mecanismos de degradación, como son las proteasas y ubiquitinas; y para contrarrestar esta degradación, existen proteínas como los inhibidores de proteasas y las chaperonas que ayudan a recobrar la configuración de las proteínas dañadas. 2) proteínas que participan en las rutas biosintéticas de los osmolitos como la pirrolina-5-carboxilasa sintetasa, la betaína aldehído deshidrogenasa y la mio-inositol 6-O-metiltransferasa, y como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. También se inducen enzimas asociadas con el transporte en las membranas, y que son requeridas para ajustar el potencial hídrico, como las ATPasas H<sup>+</sup> (Niu, 1995), acuaporinas, acarreadores y canales (Ingram y Bartels 1996). Asimismo, se expresan genes cuyos productos son importantes para la desintoxicación de la célula como son la glutatión-S-transferasa, la catalasa, la superóxido dismutasa y la ascorbato peroxidasa (Mittler y Zilinskas, 1994). Existen otros genes cuyos productos participan, principalmente, protegiendo las estructuras celulares, como las proteínas LEA (Bray, 1993). Otro grupo de proteínas inducidas está implicado en la regulación y transducción de señales como



son cinasas, factores de transcripción, fosfolipasas y proteínas 14-3-3 (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

#### PROTEINAS LEA

Las proteínas LEA son una extensa familia de proteínas vegetales que son almacenadas durante el desarrollo de la semilla (Baker, et. al. 1988), y cuya presencia en otros tejidos vegetales está restringida a situaciones de estrés osmótico. Estas proteínas se caracterizan por ser muy hidrofílicas (carecen de residuos de Cys y Trp) y termoestables. Estas propiedades les confieren sus diversas funciones, entre las que se encuentra su habilidad para atrapar agua, impidiendo la cristalización de proteínas celulares y otras moléculas durante la desecación. También se ha sugerido que pueden proteger estructuras celulares como las membranas y amortiguar los efectos del estrés hídrico, manteniendo un mínimo requerimiento de agua en la célula (Ingram y Bartles, 1996). Otras funciones asignadas a las proteínas LEA incluyen el secuestro de iones (Dure, 1993), así como una actividad de chaperonas para la protección de otras proteínas (Close, 1996) y ser guías de proteínas nucleares durante el estrés hídrico (Godoy, et. al. 1994).

Las proteínas LEA se han clasificado por el análisis de las secuencias de regiones de alta similitud entre proteínas de diferentes especies, y se han propuesto cinco familias de proteínas LEA (Buchanan, et. al. 2000):

**Familia D-19 o grupo 1:** la proteína que representa a esta familia es la Em del trigo. Más del 70% de la conformación de la proteína es azarosamente en espiral con algunas pequeñas  $\alpha$ -helices, es rica en aminoácidos cargados y en glicina, lo que hace suponer que tienen una alta capacidad para unirse al agua. Su expresión podría representar tolerancia durante un déficit hídrico.

**Familia D-11 o grupo 2:** las proteínas representativas de esta familia son DHN1 del maíz y la D11 del algodón. Este grupo de proteínas tienen una secuencia consenso EKKGIMDKIKELPG en donde el número de repeticiones varía según la proteína;



presenta una o más regiones conservadas de lisina que pueden formar  $\alpha$ -helices, también puede tener regiones ricas en residuos polares (Gly o Ala y Pro) de longitud variable, además de que puede o no presentar una región de poliserinas. Se encuentran en citoplasma y en el núcleo. Se ha propuesto que actúan como chaperonas para preservar la estructura de otras proteínas durante un déficit hídrico.

**Familia D-7 o grupo 3:** las proteínas que representan esta familia son HVA1 en cebada (inducida por ABA) y D-7 en algodón (abundante en embriones). Este grupo de proteínas tienen una secuencia consenso de 11 aminoácidos (TAQAAKEKAXE). Pueden contener  $\alpha$ -helices anfipáticas y formar dímeros. Se les ha sugerido un papel en el secuestro de iones, los cuales se concentran durante la deshidratación celular.

**Familia D-95 o grupo 4:** la proteína que representa esta familia es la D-95 de la soya. Gráficas de hidropatía han mostrado que esta proteína es ligeramente hidrofóbica, además de que es posible que contenga en la región del amino terminal una  $\alpha$ -helice anfipática. Se ha propuesto que su principal función es remplazar el agua para preservar la estructura de la membrana.

**Familia D-113 o grupo 5:** Las proteínas que representan esta familia son la LE25 del jitomate y la D-113 del algodón. En la región del amino terminal la proteína forma una  $\alpha$ -helice, y en la región del carboxilo terminal una espiral de secuencia y longitud variable. Estas proteínas son ricas en Ala, Gly y Thr. En éste grupo se encuentran las proteínas que pueden unirse a las membranas o a otras proteínas para mantener la integridad de su estructura en periodos de déficit hídricos en la célula, asimismo son proteínas que secuestran iones para proteger el metabolismo en el citoplasma durante la pérdida de agua.

**PROTEÍNAS LEA.** pLE4 Y pLE25. Los cDNAs de las proteínas pLE4 y pLE25 representan los RNAs mensajeros que se acumulan en respuesta a un déficit hídrico, como la sequía, frío, salinidad y altos niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) en plantas de jitomate (Cohen, et. al. 1991).

**pLE4.** El cDNA de pLE4 es de 856 pares de bases y contiene un marco de lectura que codifica una proteína de 130 aminoácidos (13,948 Da), hidrofílica, con una

composición de aminoácidos de Gly (22.8%), Glu (9.2%), Met (9.2%), Thr (9.2%) y Gln (8.5%). Los aminoácidos Cys, Phe y Trp no están presentes en este polipéptido. Una secuencia 'tandem' de 9 aminoácidos, <G-T-G-G-M-M-G-G-T>, se encuentra treinta aminoácidos río abajo de la Met inicial. pLE4 es muy parecida a la familia de las dehidrasas de cebada y maíz (Close, et. al. 1989), a la familia RAB del maíz (Vilardell, et. al. 1990) y del arroz, a dos polipéptidos de la familia de *Craterostigma plantagineum*, a la proteína D11 del algodón y a la RSLEA2 del rábano. Pertenece a la familia D-11 (grupo 2) de las proteínas LEA y su posible función es la de una chaperona (Dure, 1993), se expresa principalmente en hojas, pecíolos, tallos y retoños, más que en el desarrollo de la semilla y el fruto (Cohen, et. al. 1991).

pLE25. El cDNA de pLE25 está formado de 539 pares de bases, tiene un marco de lectura que codifica para una proteína de 88 aminoácidos (9,258 Da). Su composición es rica en Ala (20.5%), Thr (14.8%), Lys (13.6%) y Gly (10.2%), y es altamente hidrofílica. Al igual que la pLE4 la pLE25 no contiene Cys y Trp. pLE25 es similar a la proteína LEA (D113) del algodón con una similitud del 64% y un 55% de identidad, ambas son ricas en Ala y Gly, y carecen de Cys y Trp. La proteína pLE25 pertenece a la familia D-113 (Grupo 5) y se expresa principalmente durante el desarrollo de las semillas, en el fruto, tallo y pecíolos, pero su expresión es baja en las hojas (Cohen, et. al. 1991).

#### OSMORREGULACIÓN

La célula puede mantener su potencial hídrico a través de un ajuste osmótico, el cual se obtiene por la acumulación de osmolitos como la betaína, prolina, pinitol, fructanos, glicina-betaína, dimetil-sulfonil-propionato, sacarosa, fructosa, glicerol, trehalosa, rafinosa, ectoína (1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-carboxilpirimidina), entre otros. Estos osmolitos son solutos compatibles que no interfieren con las funciones enzimáticas en el citoplasma, y su acumulación da como resultado un potencial osmótico negativo en el interior de la célula, lo que impide la salida de agua y mantiene así la turgencia en la célula (Hasegawa, et. al. 2000).

## ESTRÉS OXIDATIVO

Diversos factores de estrés causan la producción, de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células, generando un estrés oxidativo en ellas (Bowler, et. al. 1992). El estrés oxidativo es al aumento, en exceso, de radicales libres y peróxidos como son: los singuletes ( $^1O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), el radical hidroperóxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ), y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), junto con una disminución de los sistemas antioxidantes enzimáticos de defensa como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la catalasa, la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa, y los no enzimáticos, como el glutatión, el  $\alpha$ -tocoferol, el ascorbato, los carotenoides, los flavonoides y los alcaloides (Foyer, et. al. 1994).

Los radicales libres son especies químicas (atómicas y moleculares) altamente reactivas porque tienen uno o mas electrones desapareados (ya sea por pérdida o ganancia de ellos), por lo que pueden afectar a otras moléculas como los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos y, por lo tanto, al organismo en su totalidad (Halliwell y Gutteridge, 1989).

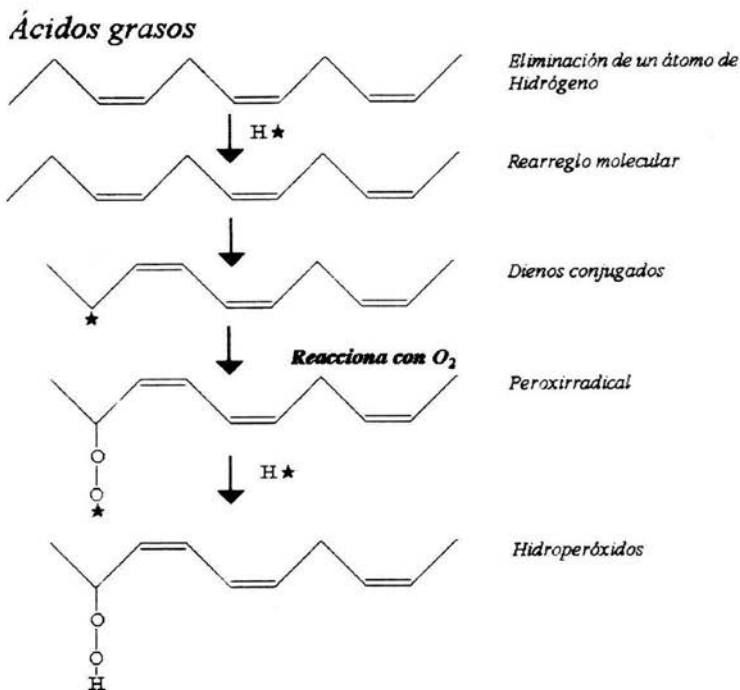
Los ROS pueden ser generados por fuentes endógenas y exógenas. Las primeras son los productos del metabolismo normal y esencial de los organismos aerobios (mitocondria y cloroplastos) o por reacciones de destoxicación (en los peroxisomas). Las fuentes exógenas incluyen algún tipo de estrés como patógenos, aleloquímicos, xenobióticos, biotoxinas, hormonas, ozono, herbicidas, metales pesados, sequía, frío, calor, deficiencia de nutrimentos, daño mecánico, intensidad de luz, y luz ultravioleta (Scandalios, 2002). Existen tres maneras por las cuales los factores ambientales pueden generar un estrés oxidativo: 1) por producción directa de ROS, por la actividad de las enzimas como la glicolato oxidasa en la fotorespiración, la NADPH oxidasa, la amino oxidasa en el citoplasma, y peroxidases en el peroxisoma (Grant y Loake, 2000). 2) por efecto de la inhibición de los mecanismos de defensa antioxidantes, dando como resultado un incremento en los niveles de ROS (Bowler,

et. al. 1994). 3) por alteraciones en las rutas biosintéticas en las mitocondrias y los cloroplastos, ocasionando el aumento de especies reactivas de oxígeno (Noctor y Foyer, 1998).

**LIPOPEROXIDACION.** La producción elevada de ROS, independientemente del origen fisiológico o factor externo que los origine, ocasiona una lipoperoxidación en las membranas, el primer blanco de los radicales libres son los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas.

La lipoperoxidación es una reacción de autooxidación, que puede ser iniciada, principalmente, por los radicales hidroxilos ( $\text{HO}^\bullet$ ) o por los radicales hidroperoxilos ( $\text{HO}_2^\bullet$ ). Estos radicales tienen la capacidad de remover un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena hidrocarbonatada de un ácido graso poliinsaturado, ocasionando que el "metileno" quede con un electrón desapareado, creando así un radical de ácido graso. Este radical, como consecuencia, realiza un rearrreglo molecular interno formando un dieno conjugado, que a su vez reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical lipoperóxido, capaz de sustraer un hidrógeno del ácido graso vecino para formar el hidroperóxido, y de esta manera continuar la reacción en cadena hasta que, eventualmente, reaccionen dos radicales libres y con ello se llegue a la terminación del proceso. Otra alternativa es, que a partir del lipoperóxido se formen los peróxidos cíclicos, los que pueden, por un lado, conducir a la formación de endoperóxidos cíclicos, o bien, se da lugar a la formación del malondialdehído (MDA) (Halliwell y Gutteridge, 1989). Como consecuencia de la lipoperoxidación, la membrana pierde fluidez, ocasionando que las proteínas membranales pierdan su actividad y sus funciones receptoras, llegando así, a ocasionar la lisis de la célula.





**Figura 2.** Oxidación de los lípidos insaturados en la membrana (tomada de Halliwell y Gutteridge, 1989).

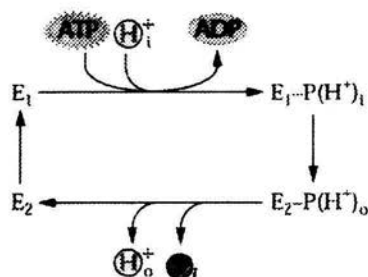
**FUNCIONES DE LOS RADICALES LIBRES.** Se ha visto que el aumento en la producción de ROS durante el estrés puede afectar la integridad de la célula, pero también es cierto que los ROS actúan como señales para la activación de respuestas al estrés (Mittler, 2002). Los ROS pueden ser vistos como indicadores celulares del estrés y como segundos mensajeros involucrados en las rutas de transducción de señales en las respuestas al estrés. Particularmente el  $O_2^{\bullet -}$  y el  $H_2O_2$  actúan como moléculas de señalamiento intracelular, y además, regulan, por un lado, la actividad de los factores de transcripción implicados en la proliferación celular, diferenciación y, morfogénesis, y por otro lado, inducen la expresión de genes de defensa (Knight y Knight, 2001). Los ROS tienen otras funciones importantes en la fisiología de la célula vegetal, por ejemplo en la respuesta al ataque por patógenos. Una de las respuestas directas a la

invasión por patógenos es la producción de grandes cantidades de ROS para provocar lo que se conoce como “estallido oxidativo” o respuesta hipersensible (HR). Las NADPH oxidasas de la membrana, las amino oxidasas en el apoplasto y las peroxidasas ligadas a la pared celular, contribuyen en la producción acelerada de ROS durante este proceso (Bolwell y Wojtaszek, 1997). Por otro lado, se ha encontrado que el ácido salicílico inhibe la actividad de la ascorbato peroxidasa y la catalasa, favoreciendo así el aumento de ROS. Además se ha visto, que el óxido nítrico (NO) ayuda a programar la muerte celular junto con los ROS, por lo tanto, el ácido salicílico, el NO y los ROS activan muchas de las defensas vegetales así como la muerte celular programada (Klessig, et. al. 2000).

#### **ATPASA DE H<sup>+</sup> DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CÉLULAS VEGETALES**

Las bombas de protones como las ATPasas H<sup>+</sup> tipo P son las encargadas del transporte activo, expulsan protones (H<sup>+</sup>) fuera de la célula en contra de un gradiente de concentración y requieren la energía de hidrólisis del ATP. Son enzimas integrales de membrana, tienen un peso molecular de aproximadamente 100 kDa y con una estructura simple en comparación con las ATPasas tipo F o tipo V. La ATPasa de H<sup>+</sup> tipo P es considerada como una “enzima maestra” que controla muchas funciones importantes a nivel celular y de órganos vegetales, incluyendo la división y elongación celular (Serrano 1989). Su estructura terciaria consta de cuatro dominios hidrofílicos citoplásmicos, altamente conservados y denominados: 1) Dominio de cinasa (sitio de unión del ATP), con una secuencia conservada de KGAP (lys, gly, ala y pro). 2) Dominio de fosfatasa (sitio de unión del Mg<sup>2+</sup>); este dominio es necesario para la hidrólisis del ATP en la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (el Mg<sup>2+</sup> interactúa con dos residuos de ácido aspártico, que están en la secuencia conservada GDGVNDAPALKKA de varias ATPasas tipo P). 3) Dominio de transducción, donde se unen los H<sup>+</sup>, y 4) Dominio inhibitorio, que contiene el carboxilo terminal (ver regulación enzimática) (Palmgern, 2001).

**MODO DE ACCIÓN.** Las ATPasas tipo-P presentan dos conformaciones  $E_1$  y  $E_2$ . La forma  $E_1$  tiene una alta afinidad por el ATP así como también por el protón que se transporta fuera del citoplasma. La forma  $E_2$  tiene una baja afinidad por ambos ligandos, pero tiene una alta afinidad por el vanadato que actúa como inhibidor. El transporte del protón del citoplasma al lado externo está asociado con el cambio conformacional entre  $E_1$  y  $E_2$ . Como se muestra en la figura 3, los protones y el ATP se unen a la enzima en la conformación  $E_1$ ; la fosforilación del residuo aspartil-fosfato resulta en la conformación  $E_1P(H^+)_i$ , la cual cambia a la conformación  $E_2P(H^+)_o$ , donde la enzima tiene baja afinidad por el protón, el cual es liberado al otro lado de la membrana. El fosfato es liberado por hidrólisis del aspartil fosfato y la conformación de la enzima  $E_2$  es restituida a la conformación  $E_1$  (Post, et. al. 1972).



**Figura 3.** Ciclo de reacción de la ATPasa de  $H^+$  tipo P (tomado de Buchanan, et. al. 2000).

**LOCALIZACION: EXPRESION EN TEJIDOS ESPECIFICOS.** Esta enzima se ha encontrado en diferentes tipos celulares de las plantas, y su concentración varía de un tipo celular a otro, encontrándose en mayor cantidad en aquellos encargados del transporte y la acumulación de solutos. Por ejemplo, en el floema que es un tejido encargado de transportar compuestos orgánicos (glucosa) a larga distancia, se han encontrado varias isoformas de la ATPasa de  $H^+$ . También es muy abundante en las raíces, en donde se ha localizado en las células epidérmicas y en la endodermis, sugiriendo que participa en el transporte de solutos al xilema (Parets-Soler, et. al. 1990).

**REGULACION AMBIENTAL.** La ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática puede ser regulada por factores de crecimiento de la planta como las hormonas vegetales,

toxinas producidas por patógenos y por la luz, todos estos factores pueden actuar como señales directas o indirectas e involucran rutas de transducción de señales (Serrano, 1989).

**REGULACION ENZIMÁTICA.** Se ha sugerido que el carboxilo terminal de las ATPasas de  $H^+$  interactúa directa o indirectamente con el sitio activo de la enzima para inhibir la actividad, limitando de alguna manera la unión del ATP y la unión del protón en el dominio catalítico, dando como resultado una conformación inactiva de la enzima, esto se ha comprobado indirectamente cuando se remueve de la enzima el carboxilo terminal por acción de la tripsina y se observa un estado de alta actividad enzimática (Palmgern, 1991).

**REGULACION POR LA FUSICOCINA Y LA PROTEINA 14-3-3.** Otro mecanismo de regulación, el cual involucra al dominio del carboxilo terminal, es el modelo de la unión con la proteína 14-3-3. Esta proteína se une a una gran cantidad de proteínas blanco en eucariontes, fosforilando a residuos de serina o treonina. Se ha sugerido que es una candidata para la regulación de las ATPasas de  $H^+$  de la membrana plasmática, porque activa a esta bomba dependiendo del estado de fosforilación de la treonina. Por otra parte, la proteína 14-3-3 se ha copurificado con la ficotoxina llamada fusicocina; la unión de éstas, activa a la ATPasa de  $H^+$ , sin necesidad de fosforilar a la treonina, pero su activación sí depende de su unión al carboxilo terminal de la enzima, y de esta manera la mantienen en un estado activo (Svennelid, et. al. 1999).

**REGULACION POR LÍPIDOS.** La composición de esteroides de la membrana plasmática vegetal influye en la actividad de la ATPasa de  $H^+$  (Grandmuogin, et. al. 1989). Los fosfolípidos activan a la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática (Memon y Boss, 1990) y pueden ser formados localmente de una manera rápida y reversible por los polifosfoinositoides, los cuales son activadores de la enzima. También se ha reportado que la auxina y la luz causan rápidos cambios en los fosfatidilinositoides, sugiriendo su participación en las rutas de transducción de señales para la regulación de la enzima. Un mecanismo alternativo para regular la ATPasa de  $H^+$  es a través de su activación



por la fosfatidilcolina, un producto de la hidrólisis fosfolipídica de la fosfolipasa A2, la cual no involucra la unión de ésta al carboxilo terminal. El efecto de los lisofosfolípidos sobre la ATPasa de  $H^+$  puede ser directo, uniéndose a la enzima y ocasionando un cambio conformacional que permita que se desplace el dominio inhibitorio, o que estimulen a una proteína cinasa las cuales a su vez son estimuladas por los lisofosfolípidos (Martiny y Scherer, 1989).

#### ***PAPEL FISIOLÓGICO DE LA ATPASA DE $H^+$ .***

Sus funciones fisiológicas principales son:

- Proporciona la energía necesaria para transportar los nutrimentos, iones y agua dentro de la célula; mantiene la turgencia celular, que está relacionada con el crecimiento y con la expansión celular (Serrano, 1989; Palmgren, 2001).
- Se le conoce como una enzima electrogénica que expulsa protones ( $H^+$ ) fuera de la célula, creando un potencial de membrana que puede exceder los -200 mV (Hirsch, et. al. 1998).
- Genera un gradiente quimiosmótico que es utilizado para transportar los solutos al interior de la célula a través de un simportador (Marre, 1979).
- Está involucrada en el movimiento de órganos y estomas, al participar en los cambios de turgencia (Morsomme y Boutry, 2000).

#### **ATPASA DE $H^+$ DE TONOPLASTO (V-ATPASA EC 3.6.1.34)**

Las tres proteínas más abundantes del tonoplasto son: las acuaporinas (canales de agua), la pirofosfatasa (V-Ppasa) y la V-ATPasa de  $H^+$ ; estas dos últimas contribuyen al gradiente de protones. La V-ATPasa de  $H^+$  (750 kDa) es la proteína más compleja y abundante (6.5-35%), está encargada del transporte activo primario y se le ha localizado en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (Matsuoka, et. al. 1997). La V-ATPasa de  $H^+$  utiliza la energía liberada de la hidrólisis del  $\gamma$ -fosfato del ATP para bombear protones dentro del lumen vacuolar (pH de 5.5) y crear un gradiente de  $H^+$  electroquímico (-90mV), el cual genera el transporte secundario de iones y metabolitos dependientes de acarreadores o canales, manteniendo la

homeostasis celular. La actividad de la V-ATPasa puede ser regulada por diversos factores ambientales (Maeshima, 2001).

**ESTRUCTURA.** La V-ATPasa de  $H^+$  consiste de 13 subunidades las cuales están localizadas en dos grandes dominios, un dominio periférico ( $V_1$ ), el cual contiene el sitio catalítico involucrado en la hidrólisis de ATP, y un dominio transmembranal ( $V_0$ ) el cual funciona como un canal para los protones. El sitio catalítico está compuesto de tres copias de las subunidades A y B, las otras subunidades (C-H) forman el tallo central, y une los dos dominios  $V_1$  y  $V_0$ . El dominio  $V_0$  está compuesto por las subunidades a y c (Ratajczak, 2000).

**ENZIMOLOGÍA.** Su estructura terciaria es muy similar a la ATPasa de  $H^+$  de la mitocondria y cloroplastos (F-ATPasa), y por este motivo se ha propuesto que la V-ATPasa de  $H^+$  puede tener un mecanismo rotacional para transportar los  $H^+$  como lo hacen las F-ATPasas (en donde la hidrólisis del ATP en el dominio  $F_1$  lleva a la rotación de la subunidad- $\gamma$ ), aunque en la V-ATPasa todavía no se sabe que subunidad es la que realmente se encarga de esta función (Ratajczak, 2000).

**REGULACIÓN.** Los inhibidores específicos de la V-ATPasa de  $H^+$  incluyen a la bafilomicina A1, concanamicina C y al nitrato (Drose, et. al. 1993). Otros compuestos químicos como las drogas W-5 y W-7, la calmidazolina y los antagonistas de canales de calcio como el verapamil y el diltiazem, también inhiben la actividad de la V-ATPasa, por lo que puede estar involucrada en la regulación de respuestas metabólicas, como un componente dependiente de calcio en la cadena de transducción de señales (Pfeiffer, 1995). La V-ATPasa puede estar regulada por diferentes mecanismos: 1) por fosforilación de su subunidad citoplásmica; 2) por modificación de su estado redox; 3) por oxidación y reducción de sus grupos sulfidrilos, presentes en la subunidad A y B; 4) por cambios en la disponibilidad del sustrato ( $Mg-ATP^{2-}$ ) en el citoplasma; y por último, 5) por los lípidos que la rodean. También puede ser regulada hormonalmente y se ha sugerido que algunas isoformas

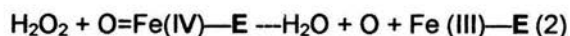
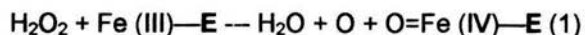
de la V-ATPasa son enzimas constitutivas y otras son expresadas bajo condiciones de estrés ambiental (Dschida y Bowman, 1995, Ratajczak, 2000).

## CATALASA

La catalasa (EC 1.11.1.6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasa, CAT) se encuentra en los peroxisomas y protege a la célula contra los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno, catalizando su descomposición en oxígeno molecular y agua, sin la producción de radicales libres.

La catalasa es una de las enzimas más eficientes que existen; en *Penicillium vitale*, está formada de cuatro subunidades idénticas (tetrámero con un peso de 220,000 a 350,000 Da); cada monómero contiene un grupo prostético que está constituido por un anillo de protoporfirina y un átomo central de hierro en el centro catalítico. La estructura primaria de cada monómero consiste de 506 aminoácidos, un grupo hemo y una molécula de NADH, tiene un pH óptimo de 7 y un punto isoeléctrico de 5.4 (Vainshtein, et. al. 1986).

Se ha propuesto que son dos etapas en las cuales la catalasa degrada la molécula de peróxido de hidrógeno:



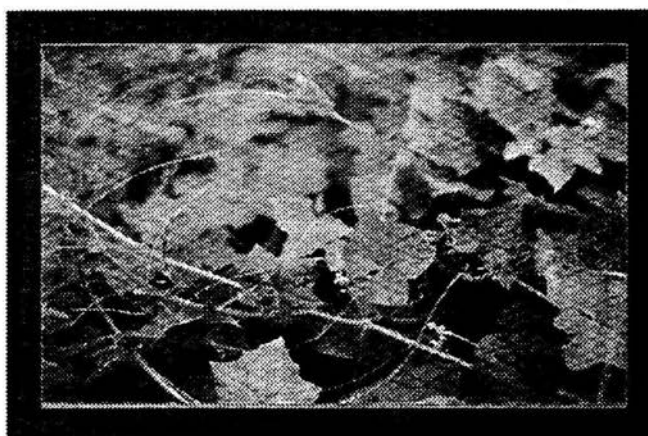
Aunque la catalasa y la ascorbato peroxidasa tienen el mismo sustrato, remueven el peróxido de hidrógeno para distintas funciones en la célula. Mientras que la ascorbato peroxidasa puede ser responsable en la regulación de ROS para el señalamiento, la catalasa puede ser la responsable de remover el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

durante eventos de respuesta al estrés (Mittler, 2002). De esta manera, la catalasa junto con las hidroperoxidasas y la superóxido dismutasa son indispensables para la desintoxicación de ROS durante periodos de estrés, previniendo así el daño celular. Asimismo, se ha observado que el estrés oxidativo causado por herbicidas, xenobióticos, ozono y por senescencia, aumenta la proliferación de peroxisomas en células vegetales (Palma, et. al. 1991; López-Huertas, et. al. 2000).

**SICYOS DEPPEI G. DON**

DISTRIBUCIÓN Y DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA (CRONQUIST, 1981)

División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Dilleniidae  
Orden: Violales  
Familia: Cucurbitaceae  
Genero: *Sicyos*  
Especie: *Sicyos deppei* G. Don



**Figura 4.** *Sicyos deppei* G. Don. maleza sumamente agresiva, que causa pérdidas en la producción agrícola de varios cultivos en la parte central de México.

*Sicyos deppei* comúnmente es conocida como chayotillo, calabacilla, atatana, tatana, tlapaloso y tlapalazón. Es una planta anual que crece en época de lluvia y su distribución abarca el Valle de México, Valle de Toluca, San Luis Potosí, Jalisco y Veracruz (Rodríguez-Jiménez, 1985), Michoacán, Puebla, Guanajuato, Querétaro y Tlaxcala (entre 1300 y 2700 msnm, principalmente en alturas > 2000 msnm), en bosques, matorrales, pastizales, orillas de arroyos, lagunas, caminos y en plantaciones de maíz, trigo, cebada, jitomate y frijol, entre otros (Kohashi-Shibata, et al. 1990).

*S. deppei* es una planta monoica, que presenta primero las inflorescencias masculinas y después las inflorescencias femeninas junto con otras masculinas, éstas últimas contienen gran cantidad de néctar favoreciendo la polinización cruzada y la entomófila. Sus tallos son ramificados de varios metros de largo (la longitud de las ramas llegan a alcanzar los 400 m), con 200 ápices en promedio; esto la convierte en una planta con un alto potencial para ramificarse con rapidez, y al mismo tiempo, en una eficiente trepadora, distinguiéndose por su exuberante crecimiento. Tiene hojas con pecíolos de 1 a 9 cm de largo, hirsutos, lóbulo terminal triangular-oblongo, ápice acuminado, márgenes serrulados, base profundamente cordada. Cada planta genera aproximadamente 37,000 frutos, los cuales una vez maduros se desprenden con facilidad de la planta (Rodríguez-Jiménez, 1985, Kohashi-Shibata, et. al. 1990).

Brechú-Franco y col. (1992) observaron que la germinación de las semillas de *S. deppei* presenta dos estrategias de latencia en el suelo, la más importante fue su testa impermeable; cuando ésta fue eliminada y la imbibición tuvo lugar, observaron una segunda latencia que fue dada por la influencia de la luz (fotoblastismo). Los autores concluyeron que esta especie mantiene una proporción considerable de semillas sin germinar por su estado de latencia relacionado con sus cubiertas seminales impermeables, generando así un banco de semillas persistente en el suelo, que es la fuente de futuras invasiones a los terrenos de cultivo. Orozco y col. (2000) estudiaron el efecto de la calidad de luz (luz blanca, rojo-rojo:lejano) sobre la germinación y el desarrollo de las semillas de *S. deppei*, y concluyeron que éstas presentan un heteroblastismo fisiológico y morfológico que favorece la permanencia de las mismas en el suelo por largos periodos de tiempo, permitiendo así una germinación espaciada, y asegurando el reclutamiento de plántulas, e incrementando su capacidad para establecerse en diversos ambientes.

Los métodos de control de *S. deppei* incluyen la eliminación de la maleza mediante deshierbes manuales, así como el empleo de herbicidas, aunque presenta resistencia al herbicida 2,4-D, ampliamente usado para arvenses de hoja ancha (Kohashi-Shibata, et. al., 1990). El mejor tratamiento para el deshierbe de *S. deppei* ha sido el uso de los herbicidas Triasulfuron, Dicamba y Bromoxinil (Urzua, 1993).

*S. deppei* es considerada una maleza muy agresiva que reduce el rendimiento de los cultivos y es difícil de exterminar por sus características biológicas y ecológicas antes descritas (crecimiento rápido y semillas heteroblasticas), que le confieren una gran ventaja adaptativa y competitiva en su medio ambiente. Por otra parte, se ha comprobado que contiene compuestos aleloquímicos que puede liberar al medio y de este modo, ejercer un efecto sobre las plantas vecinas. Actualmente se está realizando un estudio fitoquímico biodirigido de esta planta para identificar los compuestos responsables de su actividad fitotóxica, pero hasta el momento no se han identificado las estructuras de estos compuestos (Anaya, comunicación personal).

#### **LYCOPERSICON ESCULENTUM L. MILL**

División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Asteridae  
Orden: Solanales  
Familia: Solanaceae  
Genero: *Lycopersicon*  
Especie: *Lycopersicon esculentum* L. Mill.

**HISTORIA.** *Lycopersicon esculentum* L. Mill., es conocido en la parte central de México como jitomate y en el norte como tomate rojo. El jitomate junto con el chile, el chocolate, la vainilla y el guajolote, constituyen los más importantes legados de Mesoamérica al mundo. El jitomate fue domesticado en México y su nombre, en náhuatl, es "tomatl". Las variedades domésticas del jitomate vienen de dos tipos silvestres: *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*, originarios del oeste de Sudamérica. El jitomate fue introducido a Europa en el siglo XVI después de la conquista (Messiaen, 1975).

**DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.** Es una dicotiledónea herbácea, anual, pubescente semileñosa de 50 cm a un metro de altura, hojas dimorfas, flores amarillas agrupadas en racimos. Su fruto es una baya globosa, lisa, deprimida en la base con

costillas en algunas variedades y esférica, con un diámetro de aproximadamente 2-15 cm (Messiaen, 1975). El color del fruto va del rojo al amarillo-anaranjado debido a la acumulación del caroteno licopeno y de  $\beta$ -caroteno, su sabor puede ser desde muy dulce hasta ácido. Los órganos verdes (tallos, hojas y frutos inmaduros) contienen un glicoalcaloide que posee un grupo esterol, la tomatina, la cual es toxica si se ingiere (Madhavi y Salunkhe, 1998).

**IMPORTANCIA.** Es un cultivo de alta importancia alimenticia por tener un fruto muy rico y nutritivo (contiene vitamina C y A, carotenos, fierro, fósforo, calcio, potasio y muy pocas calorías), puede ser consumido crudo, hervido o en conserva como jugo; en la industria cosmética, es utilizado en la preparación de shampoo y jabones (Kalloo, 1993), y en la medicina tradicional, en los estados de Michoacán, Zacatecas y Puebla se emplea como cataplasmas para la inflamación de las anginas, pulmonía y enfermedades del riñón (Aguilar, et. al. 1994).

**ENFERMEDADES.** La planta de jitomate es atacada por una gran variedad de parásitos, algunos de ellos, comunes en México, son: bacterias (*Pseudomonas solanacearum*, *Corynebacterium michiganense*, *Xanthomonas vesicatorias*), hongos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *A. tenuis*, *A. alternata*, *Phoma destructiva*, *Corynespora cassiicola*), virus (mosaico del tabaco TMV), nemátodos (*Trichodorus spp.*, *Paratrichodorus spp.*, *Meloidogyne spp*) e insectos (*Nezara viridula*, *Laphygma frugiperda*, *Heliothis armigera*), y algunas especies de ácaros y escarabajos (Ayvar, et. al. 1994; Madhavi y Salunkhe, 1998).

Debido a su gran importancia económica a nivel mundial, el jitomate ha sido objeto de muchos estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares cuyo objetivo principal es su mejoramiento genético, con el fin de que la planta pueda tolerar enfermedades como las que se han mencionado anteriormente, y mejorar la calidad del fruto. También estos estudios han sido enfocados hacia los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico como la sequía y el frío, entre muchos otros. El jitomate es una especie muy sensible al clima frío, así como al tipo de suelo (requiere pH óptimos de



6.0 a 6.8, alta humedad, gran cantidad de materia orgánica y climas templados) (Madhavi y Salunkhe, 1998).

## ANTECEDENTES

Los estudios previos sobre el efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei*, han mostrado que inhibe significativamente el crecimiento radicular de otras plantas como: lechuga (*Lactuca sativa* L.), amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), el pasto elefante (*Echinochloa crus-galli* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L), chilacayote (*Cucurbita ficifolia* L), maíz (*Zea mays* L) y el propio jitomate (*Lycopersicon esculentum* L) (Hernández-Bautista, et. al. 1996).

Por otra parte, en un estudio sobre el efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la ultraestructura de las raíces del frijol y el chilacayote, se observaron células plasmolizadas y un mayor número de pequeñas vacuolas (Cruz-Ortega, et al. 1998). Asimismo, el patrón de síntesis de proteínas citoplásmicas de raíces de jitomate fue modificado por el lixiviado acuoso de *S. deppei*, lo que muestra que los compuestos aleloquímicos tienen un efecto en el proceso de síntesis de proteínas en las células de raíz de jitomate (Romero-Romero, et. al. 2002).

En estudios *in vitro* sobre el crecimiento del jitomate, se ha observado que esta planta es sumamente susceptible a los aleloquímicos. Los lixiviados acuosos de plantas alelopáticas como *Pedilantus tithymaloides*, *Zanthoxylum caribaeum*, *Heliocarpus sp*, *Acacia cedilloi*, *Lantana sp.* y *S. deppei*, inhiben su crecimiento radicular hasta un 80%; los de *Jatropha gumeri*, *Sebastiania adenophora*, *Zuelania guidonia* y *Callicarpa acuminata* la inhiben 50% (Romero-Romero, et. al. 2002; Cruz-Ortega, et. al. 2002 y Flores-Carmona, 2003).

Además de los estudios en el laboratorio, tenemos referencia de que en Xochimilco, el cultivo de jitomate está muy extendido y es el que recibe mayores cuidados de los campesinos (Rojas, 1983). En esta zona de cultivo, *S. deppei* es muy abundante, los

campesinos realizan un deshierbe cuando la maleza está en fase de plántula, para evitar que invada y cubra rápidamente gran parte de los terrenos de cultivo, de lo contrario, después sería imposible su control, afectando como consecuencia la producción del jitomate.

Con base en estos antecedentes, la hipótesis del presente trabajo es:

## HIPÓTESIS

Si el estrés aleloquímico producido por el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei* está causando alteraciones, como inhibición del crecimiento radicular, modificaciones en la membrana (plasmólisis), inhibición en la actividad de la ATPasa de  $H^+$ , aumento de radicales libres y la expresión de proteínas inducidas también durante el estrés hídrico, entonces el efecto del estrés aleloquímico en el jitomate, podría ser equivalente a un estrés hídrico, lo que permitiría estudiar y conocer vías de señalización comunes de ambas respuestas.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si el estrés aleloquímico provocado por el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei* induce un estado semejante al estrés hídrico en las células de las raíces de *Lycopersicon esculentum*, comparando algunas respuestas moleculares así como observaciones microscópicas del tejido radicular en ambos tipos de estrés.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Observar, por medio de microscopia de barrido, los efectos del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre las estructuras de las células de las raíces de jitomate.
2. Observar por medio de microscopia electrónica, estos mismos efectos sobre la membrana plasmática de las células de las raíces de jitomate.
3. Determinar los efectos de ambos tipos de estrés sobre la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática y del tonoplasto de raíces de jitomate.
4. Determinar si ambos tipos de estrés aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno y medir el grado de lipoperoxidación en las células de las raíces de jitomate.
5. Examinar las respuestas de las defensas antioxidantes, como la actividad de la enzima catalasa bajo el efecto de ambos tipos de estrés.
6. Determinar el efecto de los mismos sobre la expresión de las proteínas LEA (pLE4 y pLE25) en raíces de jitomate.

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO Y ESTRÉS ALELOQUÍMICO

*Sicyos deppei* se colectó en la Reserva Ecológica del pedregal de San Ángel en Ciudad Universitaria, D. F. La parte aérea de la planta se secó durante dos días en una estufa a 27-30° C para posteriormente ser utilizada.

Las semillas de *Lycopersicon esculentum*, L (Solanaceae), variedad Río Grande, se obtuvieron de PETOSEED, SATICOY, CA, USA.

### BIOENSAYOS *IN VITRO*

Los bioensayos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar.

**PROCESAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE PRUEBA.** Las semillas de jitomate se lavaron con detergente y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (comercial) al 10% (lo que equivale a 0.5% de NaOCl) por 5 min. Posteriormente, se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada estéril para quitar los residuos de cloro.

**PREPARACION DEL LIXIVIADO ACUOSO.** El lixiviado acuoso se obtuvo remojando 3 g de la parte aérea seca de *S. deppei* en 300 mL de agua bidestilada estéril durante tres horas. El lixiviado se esterilizó por medio de un filtro Millipore con membranas de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ . La presión osmótica (mOsm/L) del lixiviado se midió con un osmómetro (OSMETTE A) de punto de congelación con el fin de no rebasar el límite de tolerancia de las semillas de prueba a este factor (Anaya y Pelayo-Benavides, 1997).

**SUSTRATO PARA LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.** En cajas de petri (6 cm de diámetro) se adicionaron 3 mL del lixiviado acuoso de *S. deppei* al 1% y 3 mL de agar al 2%, para tener una concentración final de 0.5% del lixiviado. El control consistió en cajas con 3 mL de agua destilada estéril y 3 mL de agar al 2%. Una vez solidificado el agar se colocaron 10 semillas de jitomate por caja en cada tratamiento.

### **ESTRÉS HÍDRICO**

**CURVA DE CRECIMIENTO RADICULAR DE JITOMATE BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PEG 8000.** Con el objetivo de tener una presión hídrica que inhibiera el crecimiento radicular del jitomate en la misma proporción que el lixiviado acuoso al 0.5% de *S. deppei*, se elaboró una curva de crecimiento sobre concentración de polietilén glicol 8000 (J. T. Baker). Las concentraciones utilizadas fueron 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 15% (P/V). La osmolaridad de cada solución se determinó utilizando un osmómetro (OSMETTE A), en unidades de mOsm/L, y se determinó la presión osmótica en unidades de MPa utilizando la conversión siguiente:

$$1000 \text{ mOsmol} = 22.4 \text{ atm.}$$

$$1 \text{ atm} = 101,325 \text{ Pa}$$

Los bioensayos se realizaron en cajas de petri (6 cm de diámetro) a las cuales se les adicionaron 3 mL de agar (Merck) al 2% y 3 mL del doble de cada concentración de PEG 8000 con el fin de obtener las concentraciones de PEG mencionadas. Se hicieron cuatro repeticiones por tratamiento y por medio del análisis estadístico PROBIT se determinó que  $-0.16 \text{ MPa}$  (3% PEG) inhibieron el crecimiento radicular del jitomate 50%, y  $-0.28 \text{ MPa}$  (12% PEG) lo inhibieron 80%; este último resultado fue similar al obtenido con el lixiviado acuoso (0.5%) de *S. deppei*. Por esta razón los siguientes bioensayos se realizaron utilizando PEG 8000 al 12% ( $-0.28 \text{ MPa}$ ) (ver resultados). Una vez mezclado el agar con el PEG tuvieron una presión osmótica de  $-0.328 \text{ MPa}$ , causando la misma inhibición del crecimiento radicular.

**DISEÑO EXPERIMENTAL.** En todos los casos, se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento en un diseño completamente al azar, las cajas de petri se colocaron en una estufa de germinación a 27 °C en la oscuridad. Después de 72 h se determinó el porcentaje de germinación y la longitud radicular (mm) de las plántulas de jitomate. Los datos de crecimiento radicular fueron analizados por medio de la prueba estadística ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

**OBTENCIÓN DE LAS RAÍCES.** Para la extracción de proteína, se utilizaron 60 cajas de petri por cada tratamiento (control, lixiviado de *S. deppei* y PEG). Después de 72 h, las raíces se cortaron, se congelaron y homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El tejido se guardó a -70 °C para su uso posterior.

#### **OBSERVACIONES EN MICROSCOPIA DE BARRIDO Y ELECTRÓNICA.**

Estas observaciones se realizaron en la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. De cada tratamiento (*S. deppei*, PEG y control) se tomaron 5 raíces de jitomate y se cortaron 3 mm a partir de la cofia e inmediatamente se colocaron en un amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 7, sacarosa 60 mM y glutaraldehído al 3%. Posteriormente, las raíces fueron post-fijadas durante 3 h en un amortiguador de fosfato de sodio pH 7.2, con tetróxido de osmio al 2% y se sumergieron en resina fresca (Epon 812, Spi-Chem), donde se dejaron polimerizar por 48 h a 60°C. Los cortes de las raíces (600 a 800 Å) se hicieron con un microtomo de Reichert-Jung, e inmediatamente se colocaron en una solución de acetato de uranilo al 2% y citrato al 2%. Después de esta fijación las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII. En el caso de las muestras para Microscopia de barrido éstas fueron cubiertas con oro y se observaron en un microscopio Jeol JSM-5410LV.

## MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPASA DE H<sup>+</sup> (EC 3.6-1.35)

**EXTRACCIÓN DE FRACCIONES MICROSOMALES.** El tejido de raíz molido, de todos los tratamientos, se homogenizó con un polytron (Tissue Tearor Biospec Products INC WI, USA), en un amortiguador de homogenización [HEPES 50 mM (Sigma), Sorbitol 250 mM (Sigma), EDTA 1 mM (Sigma), KCl 1 mM (J. T. Baker), DTT 5 mM (Bio-Rad), mezcla de inhibidores de proteasas 40 µL/mL (Boehringer Mannheim)], en una relación de 3 g de tejido por 1 mL de amortiguador. Este homogeneizado se centrifugó dos veces, la primera a 3000 g y la segunda a 13,000 g durante 10 min a 4°C, en ambas centrifugaciones se desechó el botón. Por último, el sobrenadante se centrifugó a 80,000 g por 1.5 h a 4°C para obtener las fracciones microsomales (botón). El botón se resuspendió con 80 µL de amortiguador de solubilización (Sorbitol 500 mM, K-Pi 5 mM, pH 7.8 (J. T. Baker), KCl 0.2 mM y DTT 5 mM) y se guardaron en alícuotas de 25 µL a -70°C, de acuerdo al procedimiento descrito por Sánchez Nieto, et. al. (1997). La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976).

**DETERMINACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL ATP Y DE Pi.** Los tubos de ensayo fueron previamente lavados en ácido sulfúrico (3:1 v/v) (J.T. Baker) para evitar contaminación de fosfatos. A todos los tubos se les añadió 150 µL del medio de hidrólisis [Sacarosa (Sigma) 200 mM/ 20 mM MOPS (Sigma)/ BTP (Sigma) pH 7.0, CCCP 7 µM (Sigma), MgCl<sub>2</sub> 10 mM (Sigma), ATP/BTP 10 mM pH 7.0 (Sigma), Brij. 0.015% (Sigma)]. A los primeros tres tubos de cada tratamiento no se les añadió inhibidores (para medir la hidrólisis de las ATPasas totales de la fracción microsomal). En una secuencia de tres tubos por tratamiento se les añadieron los siguientes inhibidores, 9 µL de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM (Sigma) [el cual inhibe la actividad de las ATPasas de H<sup>+</sup> de membrana plasmática (EC 3.6.1.35) (Serrano, 1989; Briskin y Hanson, 1992)], 15 µL de Tris-NO<sub>3</sub> 1M (Sigma) [el cual inhibe la ATPasa H<sup>+</sup> de tonoplasto (EC 3.6.1.34) (Drose, et. al. 1993)], 3 µL de NaN<sub>3</sub> 100 mM (Sigma) [para inhibir las ATPasas H<sup>+</sup> de mitocondria (Gallego y Leonard, 1982)]. Todos los tubos

se incubaron de 5 a 10 min a 30°C. A los tubos blancos (sin hidrólisis de ATP), se les añadió 150 µL de SDS al 24% (Bio-Rad), con el fin de desnaturalizar a las proteínas (sirven como blanco porque no hay hidrólisis de ATP). A todos los tubos se les añadió 2 µg de proteína dando un intervalo de tiempo constante de 20 segundos entre la adición a cada tubo. Los tubos se incubaron por 1 h a 30 °C, después de este tiempo se le añadieron a cada tubo 150 µL de SDS al 24%, con el intervalo de 20 segundos entre tubo y tubo; después los tubos se colocaron a temperatura ambiente, según el método descrito por González-Romo, et. al. (1992) y Sánchez-Nieto, et. al. (1997).

Se realizó una curva patrón con una solución 1 mM de fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (J. T. Baker), de la siguiente manera:

Tubo	Pi (1 mM)	SDS (24%)	Reactivo BC	Incubar (3-10 min)	Reactivo E	Incubar 10 min	Medir A850nm
1	0	150 µL	300 µL	"	450 µL	10	"
2	0	"	"	"	"	"	"
3	10 µL	"	"	"	"	"	"
4	20 µL	"	"	"	"	"	"
5	40 µL	"	"	"	"	"	"
6	60 µL	"	"	"	"	"	"

Para medir la hidrólisis del ATP, a todos los tubos de la reacción así como a los de la curva de fosfatos, se les añadieron 300 µL de reactivo BC (ác. ascórbico 12% (Sigma) disuelto en HCl 1 N (J.T.Baker) y molibdato de amonio al 2% disuelto en HCl 1 N (J.T. Baker) 1:1. Después se les añadieron 450 µL del reactivo E [ácido acético glacial 2% (J.T. Baker), metaarsenito de sodio 2% (Aldrich) y citrato de sodio 2% (J.T. Baker)]. En este paso fue importante el no rebasar un intervalo de 10 min entre



el reactivo E y el BC, ni tampoco añadirlo antes de tres min. Los tubos se mezclaron bien y se leyó su absorbencia a 850 nm.

Con las absorbencias que se obtuvieron de la curva patrón de fosfatos, se realizó una regresión lineal y se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el factor de correlación ( $r^2$ ). Se promediaron las tres repeticiones de cada inhibidor y con este promedio se calcularon los nmolPi  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  de cada tratamiento con la siguiente formula:

$$(A_{\text{prot}} - A_{\text{blan}}) \times A / \text{nmol Pi} \times 1000 / [ ] \mu\text{g} \div \text{Tiempo (incubación)} = \text{nmolPi: mg}^{-1} \text{min}^{-1}$$

Donde:

A = 1/m: inversa de la pendiente de la curva de fosfatos.

[ ]  $\mu\text{g}$  = Concentración de las proteínas en  $\mu\text{g}$  añadida a cada tubo.

Los datos de los tratamientos fueron analizados por medio de la prueba estadística ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

#### **MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA POR GELES DE ACTIVIDAD**

**EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.** El tejido de raíz molido con nitrógeno líquido se homogenizó en un polytron con amortiguador de fosfatos [K-PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.8, EDTA 1 mM (Sigma)] en una relación de 100 mg/mL. Las muestras se centrifugaron a 3,000 g por 10 min a 4°C para remover los restos celulares. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976).

**PREPARACIÓN Y TINCION DEL GEL NATIVO.** El gel se preparó según el método de Laemmli (1970). Treinta  $\mu\text{g}$  de proteína de cada tratamiento se separaron en un gel de 6% de acrilamida (Bio-Rad), Tris-HCl 1.5 mM pH 8.8. La electroforesis se llevó a cabo por 5 h a 40 Volts. Para visualizar las bandas de actividad de la catalasa se

siguió el método descrito por Harris y Hopkinson (1976), modificado por Chary y Natving (1989). Al finalizar la electroforesis los geles se sumergieron en una solución de metanol al 5% por 5 min, se enjuagaron con agua destilada y posteriormente se incubaron en una solución de  $H_2O_2$  al 0.03% (Mallinckrodt 30%) por media hora. Después de ese tiempo los geles se enjuagaron con agua destilada y las bandas de actividad se revelaron con una solución de ferrocianuro de potasio 2% (J.T. Baker) y cloruro férrico 2% (J.T. Baker). Durante esta reacción donde hay  $H_2O_2$ , y en la presencia de cloruro férrico, el ferrocianuro de potasio se oxida formando un precipitado azul; en cambio, en las regiones del gel donde hubo actividad de catalasa, y por lo tanto no hay  $H_2O_2$  este precipitado no se forma, observándose formas claras en el gel. En el momento de observar las bandas de actividad la reacción se detiene agregando una solución de ácido acético al 10% y metanol al 30%.

#### **MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA POR ESPECTROFOTOMETRÍA**

**EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.** La técnica de extracción de proteínas se realizó de la manera descrita anteriormente, con la única variante que consistió en pasar el sobrenadante a través de una columna de Sephadex G25 (Sigma) para eliminar compuestos de bajo peso molecular que interfieren con la medición de la actividad de la enzima (Anderson, et. al. 1995); el filtrado se colectó por centrifugación a 3,000 g por 5 min a 4°C. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976).

**MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.** Para medir la actividad de la catalasa se siguió el método descrito por Beers y Sizer (1952), utilizando 50  $\mu$ g de proteína. El medio de reacción contenía 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$  al 0.03% como sustrato y un amortiguador de  $K-PO_4$  a pH 7, en un volumen total de 1 mL. Se midió el consumo de  $H_2O_2$  a 240 nm en intervalos de 20 segundos durante 3 min utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU 640). El blanco consistió en 700  $\mu$ L de

amortiguador de fosfatos y agua destilada estéril y el control en 700  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos, 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.03%. La determinación de la actividad de la catalasa se realizó con tres repeticiones y muestras de tres experimentos por separado. La cantidad de sustrato consumido (moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la cantidad de proteína contenida (mg) por el tiempo, se calculó con la siguiente fórmula:

$$(m / \epsilon \times \text{prot}) / 1000 \times 60 = m \text{ mol} / \text{mg} / \text{min}$$

Donde:

$m$  = Pendiente

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar ( $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

1000 = Factor de conversión por volumen para pasar de Mol a mmol

60 = Factor de conversión de tiempo (minutos)

prot = Proteína en miligramos

Los datos de los tratamientos fueron analizados por medio de la prueba estadística ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

### **MEDICIÓN DE RADICALES LIBRES POR QUIMIOLUMINISCENCIA**

Para la medición de radicales libres por quimioluminiscencia se utilizó la técnica descrita por Cadenas y Helmut (1984). El luminol, que es el reactivo utilizado, es fácilmente oxidado por los radicales libres [superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) y el oxígeno en singulete ( $^1\text{O}_2$ )], a un anión aninofalato electrónicamente excitado, que cuando baja a su estado basal emite fotones, lo que hace posible medirlos en un contador de centelleo.

El amortiguador de reacción, en un volumen final de 4 mL, contenía: acetato de amonio 0.5 M pH 10.5 (J.T Baker), cloruro de cobalto 250  $\mu\text{M}$  (Sigma) y luminol 50  $\mu\text{M}$  (Sigma) con carbonato de sodio 1 mM (J.T. Baker); esta solución se incubó durante 10 min en la oscuridad. Después de este tiempo, en un contador de centelleo

(programado para medir quimioluminiscencia, Beckman LS6000SE), se realizó la primera lectura de los viales que contenían sólo el amortiguador, a ésta se le consideró como la lectura inicial. Después, en la oscuridad, a cada vial se le añadió 60 µg de proteína de los diferentes tratamientos (control, *S. deppei* y PEG), las muestras se volvieron a leer en el contador y se tomó como lectura final el conteo mayor.

La cantidad de radicales producidos se determinó con la siguiente fórmula:

Cantidad de radicales = [cpm de la lectura final – cpm de la lectura del blanco] / 0.060 mg de proteína.

Dónde: Cpm = cuentas por minuto

Los resultados se reportaron como el promedio de tres repeticiones de tres experimentos diferentes. Y se analizaron por medio de la prueba estadística ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

#### **MEDICIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN**

Para cuantificar el daño producido por los radicales libres sobre la membrana se realizó la técnica de detección de dienos conjugados descrita por Racknagel y Glende (1984). En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 mg de proteína cuyo volumen se ajustó a 1 mL con agua bidestilada estéril y se le añadieron 4 mL de solución de Folch [cloroformo-metanol 2:1 (J.T. Baker)]. Los tubos con las muestras se agitaron por 30 segundos y se dejaron reposar en hielo durante media hora. Las muestras se centrifugaron a 7000 g por 5 min para separar las fases de cloroformo, proteína y metanol. La fase inferior de cloroformo fue extraída del tubo y se transfirió a un tubo limpio. Los tubos se colocaron en baño de agua (60 °C) para evaporar el cloroformo. Después se añadieron 1.5 mL de ciclohexano puro, se agitaron las mezclas

perfectamente y se midió su absorbencia a 233 nm, utilizando ciclohexano puro como blanco.

#### **EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS LEA**

Los cDNAs de las proteínas pLE4 (no. Accesoión X51904) y pLE25 (no. Accesoión M76552) de *L. esculentum* fueron donadas por la Dra. Elizabeth Bray de la Universidad de California, Riverside, USA.

**CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO LB (LURIA-BERTANI).** Con el fin de multiplicar la cantidad de plásmidos, la colonia de bacterias con los cDNAs de las proteínas pLE4 y pLE25 (clonadas en el vector pBS-SK) se cultivo en 3 mL de medio líquido de LB [bacto triptona 1% (Difco), extracto de levadura de cerveza 0.5% (Difco), NaCl 1% (Sigma) y ampicilina 100 µg/mL (Sigma)]. A cada tubo con 3 mL de medio se les inoculó una colonia de bacterias y posteriormente se pusieron a crecer a 37°C a 250 rpm durante toda la noche en un agitador (Environ Shaker). Esta preparación se utilizó para la obtención del plásmido.

**PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO.** El plásmido se obtuvo utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones específicas del fabricante. El plásmido de las clonas se eluyó de las columnas añadiendo 35 µL de agua bidestilada estéril. La cantidad de plásmido se midió por medio de un espectrofotómetro a 260/280 nm. Posteriormente, se digirió con las enzimas de restricción EcoRI (10 U/µL) y con Hind III (10 U/µL) (Invitrogen) para obtener los cDNAs de pLE4 y pLE25 (Sambrook, et. al. 1989).

Los cDNAs de las proteínas pLE4 y pLE25 se identificaron por su tamaño, utilizando un marcador de DNA 1 µg/µL (GIBCOBRL) en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% [TAE y 0.1 µg/1mL de bromuro de etidio) (Sigma)]. El tamaño de la pLE4 es de 856 pb y el de la pLE25 de 539 pb.

**EXTRACCIÓN DE LAS SONDAS EN GEL DE AGAROSA.** Una vez identificados los cDNAs de las proteínas pLE4 y pLE25 en el gel, se extrajeron con un kit de extracción de DNA en gel de agarosa (Roche), siguiendo las instrucciones específicas del fabricante. El DNA obtenido se cuantificó utilizando un fluorómetro DyNA Quant 200 (Pharmacia Biotech).

**MARCAJE.** Para el marcaje no radioactivo de los cDNA de las dos proteínas LEA utilizamos el Kit de DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit II (Roche), a partir de 3 µg de cDNA concentrados en 16 µl de cada una de las sondas pLE4 y pLE25. Se colocaron después en un tubo eppendorf por separado y se desnaturalizaron a 90 °C por 10 min. Se les añadieron 4 µL de la mezcla 5X que contiene: los cebadores arbitrarios, los nucleótidos, la digoxigenina-dUTP (DIG-dUTP) y la enzima Klenow. Los tubos se incubaron a 37° C durante 20 h (siguiendo las instrucciones del manual) y la reacción de marcaje se detuvo calentando las muestras en baño maría a 65 °C por 10 min.

#### **EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL Y NORTHERN BLOTS**

**EXTRACCIÓN DEL RNA.** El RNA total se aisló de las raíces de jitomate de los tres tratamientos (control, *S. depei* y PEG) utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen). Brevemente, se colocaron 100 mg de tejido (de cada muestra) en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y tratado con agua DEPC [dielil pirocarbonato (Sigma)] y se les añadió 1 mL de Trizol y 10 µL de DEPC; se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Las muestras se centrifugaron a 8,000 g por 10 min a 4°C dos veces. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se le añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma), se agitó vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente por 3 min. Después de la incubación se centrifugó a 8,000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le agregaron 0.5 mL de fenol: cloroformo: alcohol-isoamílico (Sigma), las muestras se agitaron de 15 a 30 segundos y se centrifugaron a 8,000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo a

cada uno de ellos se le añadieron 0.5 mL de cloroformo. Las muestras se agitaron cuidadosamente y se centrifugaron a 8,000 g por 15 min a 4°C. Después de esta centrifugación se obtuvo la fase acuosa y se le añadieron 120 µl de ácido acético 1 M y 700 µL de etanol absoluto para precipitar el RNA. Las muestras se colocaron en frío durante 90 min y después se centrifugaron a 8,000 g por 20 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y el botón de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75% (Merk) dos veces, centrifugando a 2,000 g por 5 min cada una. El exceso de etanol se retiró y el botón se disolvió con 30 µl de agua DEPC estéril.

**CUANTIFICACIÓN DEL RNA.** La concentración y la pureza de las muestras de RNA fueron determinadas, leyendo estas en el espectrofotómetro a 260 nm y a 280 nm. Las medidas de absorción en este margen permiten el cálculo directo de la concentración de los ácidos nucleicos.

Para la cuantificación se utilizó la siguiente relación:

$$\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{FD}$$

Donde:

$A_{260}$  = absorbencia a 260nm

0.04 = coeficiente de extinción de RNA

FD = factor de dilución: µl de muestra /mL de agua DEPC

La pureza de las muestras de RNA se obtuvo mediante la tasa de las absorbencias 260/280 nm. Una muestra de RNA debe de tener una tasa  $A_{260}/A_{280}$  de 1.6 a 1.8.

**GEL DE AGAROSA-FORMALDEHÍDO.** La integridad del RNA total y los northern blots se observaron en un gel de agarosa al 1.2%. Se pesaron 0.36 g de agarosa (GIBCO BRL) con amortiguador MOPS 5X y formaldehído 1.7% (37% Sigma). Para cada gel se utilizaron 30 µg de RNA por cada tratamiento. Las muestras de RNA fueron calentadas a 65°C por 10 min y se les añadió un amortiguador de carga que contenía

formamida 50% (Sigma), formaldehído 6.5% y MOPS 1X, posteriormente se calentaron a 55°C por 10 min y se cargaron en el gel, la electroforesis se corrió 1.5 h a 75 Volts.

**NORTHERNS BLOTS.** Después de la electroforesis el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.1 µg/mL) en 150 mL de amortiguador 0.5 X de TBE por 30 min; posteriormente el gel fue lavado en amortiguador 0.5 X de TBE con el fin de remover todos los residuos de formaldehído y de bromuro de etidio. Después se observó en el transiluminador de UV y se tomó una fotografía del gel.

**ELECTROTRANSFERENCIA.** Se utilizó una cámara de transferencia semihúmeda para ácidos nucleicos y proteínas (Bio-Rad) con una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim). La membrana de nylon se equilibró por 10 min en amortiguador 0.5 X de TBE (la membrana y los papeles filtro tenían las mismas dimensiones del gel). Sobre el plato del ánodo del aparato de transferencia se colocó un papel filtro (Bio-Rad) previamente humedecido con amortiguador 0.5 X de TBE. Encima del papel filtro se colocó la membrana y después el gel de agarosa que contenía las muestras de RNA; se le colocó otro papel filtro previamente humedecido con amortiguador. En todos estos pasos se tuvo el cuidado de remover cualquier burbuja formada entre las diferentes capas. Por último, se añadieron 7 mL del amortiguador 0.5 X TBE, se colocó el soporte y se dejó transferir por 1 h a 20 Volts. Pasado el tiempo de la transferencia, la membrana se lavó en 2X SSC y el RNA se fijó en UV-crosslink (STRATALINKER) y se dejó secar en papel filtro para posteriormente realizar la prehibridación.

#### **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PLE4 Y PLE25 POR NORTHERN BLOTS.**

**PREHIBRIDACIÓN.** Se precalentaron 10 mL del DIG Easy Hyb a 50°C, se colocó la membrana y se dejó prehibridizar a 50°C por 2 hrs.



**HIBRIDACIÓN.** El cDNA (25 ng/mL) de las proteínas pLE4 y pLE25 que anteriormente se habían marcado con el DIG High prime, se le añadió a los 5 mL del DIG Easy Hyb y se desnaturalizó por ebullición durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo. La membrana se sumergió dentro de esta solución para hibridar durante 20 h a 42 °C.

**LAVADOS CON SSC.** Al terminar la hibridación la membrana se lavó en 30 mL de SSC 2 X con 0.1% de SDS por 15 min a temperatura ambiente (dos veces). Después fue lavada en 30 mL de SSC 0.5 X con 0.1% de SDS por 15 min a 55°C.

**DETECCIÓN.** La membrana se colocó en 20 mL de amortiguador de lavado [100 mL amortiguador de ácido maleico (Sigma) y Tween 20 al 0.03% (Sigma)] por 1 min. Después se incubó por 1 h a temperatura ambiente en 10 mL de solución bloqueadora (1mL de solución bloqueadora 10X diluida en 9 mL de amortiguador de ácido maleico). Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo (Anti-Digoxigenin-AP conjugado) en solución bloqueadora fresca durante 30 min a 37°C. La membrana se enjuagó dos veces con amortiguador de lavado durante 15 min a temperatura ambiente y después se incubó con el amortiguador de detección (Tris-HCl 0.1 M y NaCl 0.1 M pH 9.5) durante 2 min a temperatura ambiente. Por último la membrana se colocó con la cara del RNA hacia arriba en un acetato y se le aplicaron 0.5 mL de CSPD (sustrato quimiolumincente de fosfatasa alcalina), se cubrió con otro acetato y se incubó por 30 min a 37°C. La membrana se expuso a una placa radiográfica por 2.5 h.

## RESULTADOS

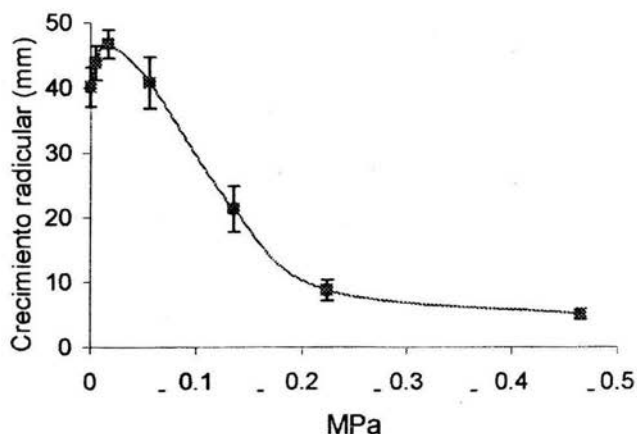
### ESTRÉS HÍDRICO: CURVA DE POLIETILEN GLICOL

La presión osmótica se determinó para las diferentes soluciones de PEG 8000, y los valores respectivos (MPa) se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Presión osmótica de las diferentes soluciones de polietilen glicol 8000.

Concentración (%) PEG (g/v)	Presión Osmótica (MPa)
0	0.000
1	-0.005
3	-0.017
6	-0.056
9	-0.135
12	-0.228
15	-0.465

Con estas concentraciones se realizó una curva de crecimiento radicular de *L. esculentum* (para lograr una inhibición radicular equivalente a la causada por el lixiviado de *S. deypei* sobre semillas de jitomate). La figura 5 muestra el efecto del PEG sobre el crecimiento radicular de jitomate.



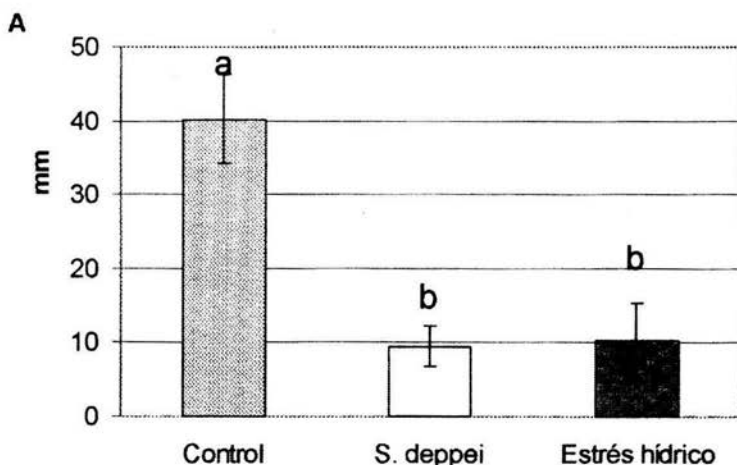
**Figura 5.** Efecto de la presión osmótica de las 7 concentraciones de PEG 8000 sobre el crecimiento radicular de jitomate a 27 °C. La medición de la raíz se realizó a las 72 hrs.

Por medio del análisis estadístico PROBIT se determinó que a  $-0.16$  MPa, la solución de PEG inhibió 50% el crecimiento radicular del jitomate y a  $-0.328$  MPa (12% PEG 8000 con 1% de agar), la inhibición fue de 80% (figura 5), similar a la causada por el tratamiento con el lixiviado acuoso (0.5%) de *S. deypei* (figura 6 A). Sin embargo, Este último no afectó el porcentaje de germinación de semillas de jitomate (Tabla 2), en cambio, el estrés hídrico ( $-0.328$  MPa) si causó una inhibición significativa en la germinación (lo que se determinó por medio de un ANOVA).

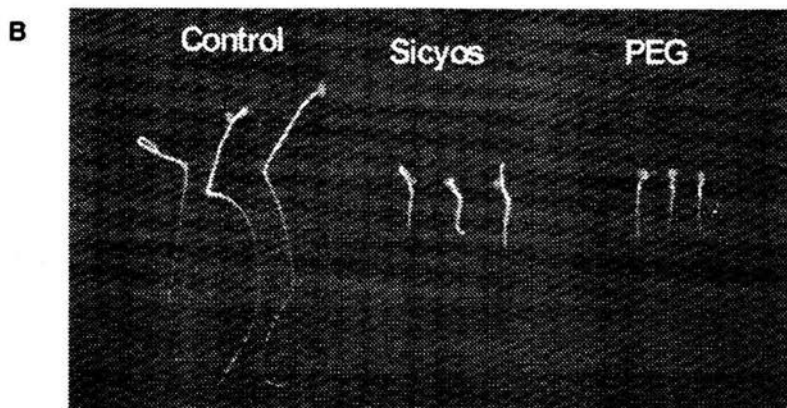
**Tabla 2.** Efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre el porcentaje de germinación de semillas de jitomate.

Tratamientos	MPa	Germinación
Control	0.0	90 ± 2 (a)
estrés aleloquímico	-0.028	87 ± 1 (a)
Estrés hídrico	-0.328	80 ± 1 (b)

El estrés hídrico y el aleloquímico inhibieron 75% y 76% el crecimiento de la raíz de jitomate respectivamente (Figura 6 A y B). Éste resultado sugiere que los compuestos contenidos en el lixiviado, al igual que la falta de agua, pueden estar afectando diversos procesos celulares que no permiten el desarrollo normal de la raíz, un órgano esencial en la absorción de agua y nutrientes para la planta.

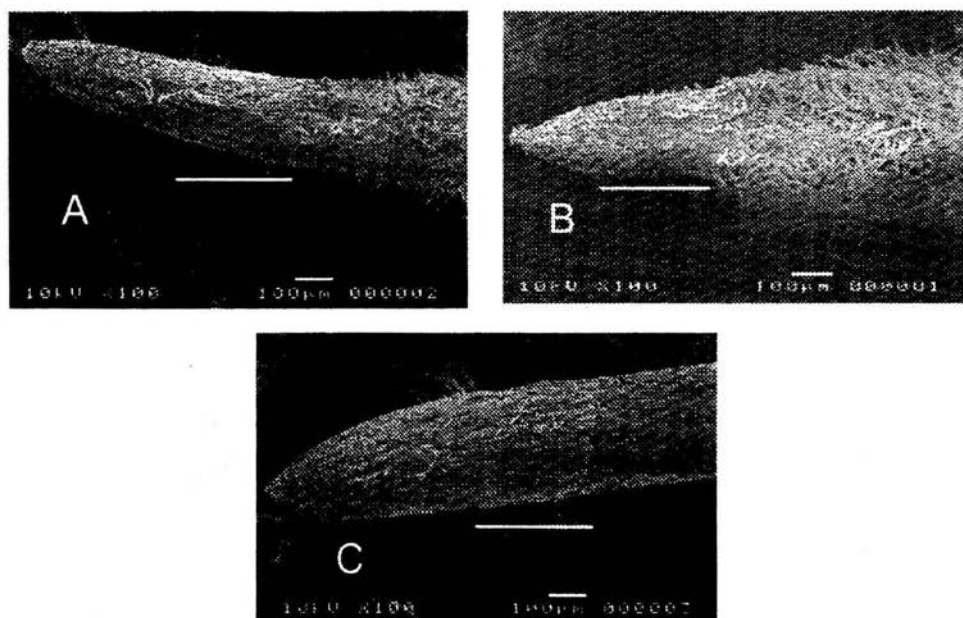


Letras diferentes son estadísticamente significativas. Duncan ( $p < 0.05$ )



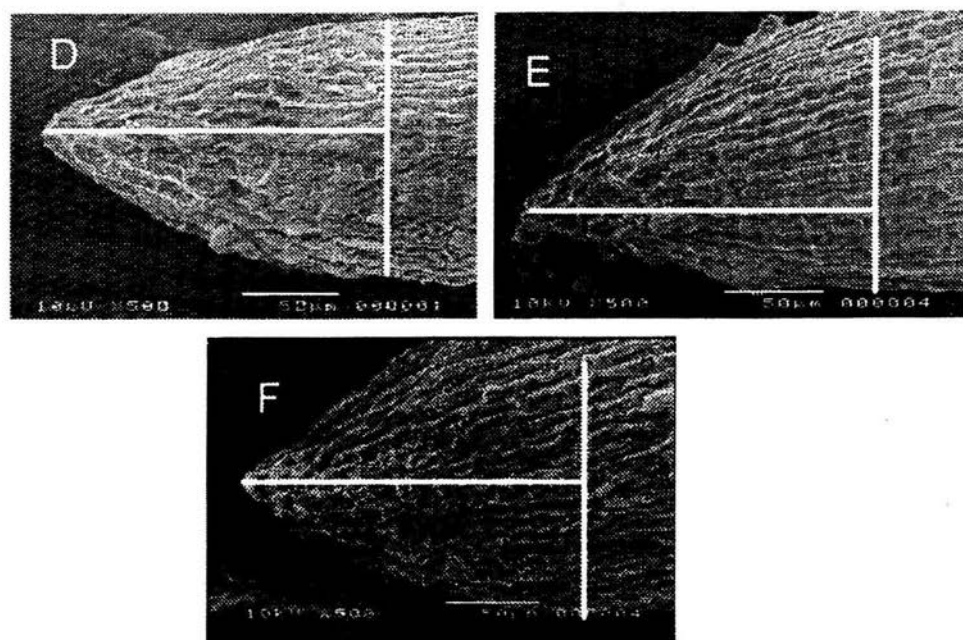
**Figura 6 A.** Efecto del lixiviado acuoso de las hojas secas de *S. deppei* (0.5 % = - 0.028 MPa) y del estrés hídrico (-0.328 MPa) sobre el crecimiento radicular del jitomate, después de 72 h de germinación. ( $p < 0.05$ ). **B** Apariencia de las raíces de jitomate a las de 72 h con los tres tratamientos.

En la figura 6 B podemos observar que además de la inhibición, la apariencia de las raíces es diferente en los tratamientos, las expuestas al estrés aleloquímico eran muy duras y con un color oscuro, en cambio, las raíces expuestas al estrés hídrico eran bastante frágiles y de color blanco.



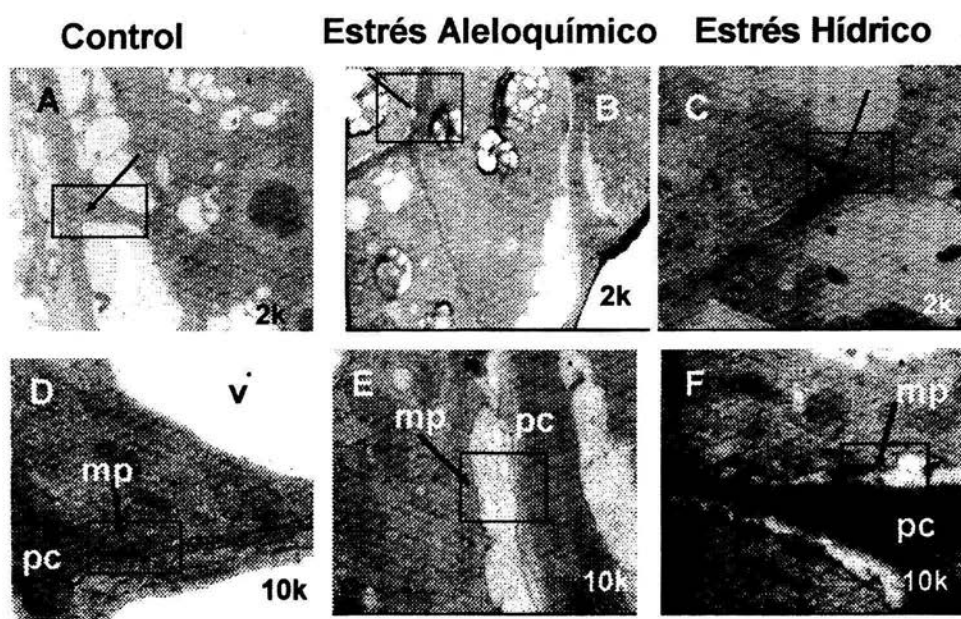
**Figura 7.** Efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre la ultraestructura de la raíz de jitomate. Microscopía de barrido de raíces de jitomate 100 X. Control (A); estrés aleloquímico (B); estrés hídrico (-0.328 MPa) (C).

En las raíces tratadas con el lixiviado de *S. deppei* (figura 7 B), se observaron alteraciones morfológicas importantes como el aumento de pelos radiculares e inhibición de la zona meristemática y de la zona de elongación. Las raíces sometidas al estrés hídrico (figura 7 C) también presentaron una inhibición de la zona meristemática y de la zona de elongación, pero no hubo la presencia de pelos radiculares. Estos resultados coinciden con efectos reportados que causa el estrés hídrico, como son la disminución en el crecimiento y que la raíz no alcanza su desarrollo óptimo (Chiatante, et. al. 1999).



**Figura 8.** Efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre la cofia y zona meristemática de las raíces de jitomate, evaluado por microscopia de barrido (500X). Control (D), estrés aleloquímico (E) y estrés hídrico (F).

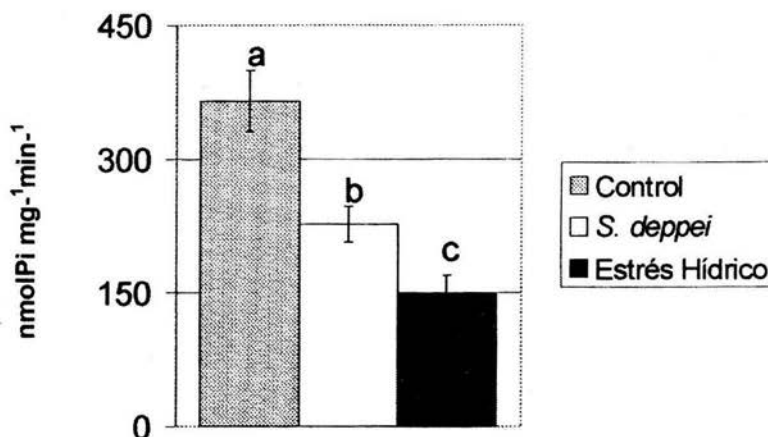
Observaciones en el microscopio de barrido a 500X mostraron que ambos tipos de estrés causaron un engrosamiento en la zona meristemática de las raíces de jitomate (figura 8 E y F).



K=1000 X

**Figura 9.** Efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre células de la periferia de la cofia de las raíces de jitomate, evaluados por microscopía electrónica de transmisión. Control (A, 2 K) y (D, 10K); estrés aleloquímico (B, 2 K) y (E, 10 K); y estrés hídrico (C, 2 K) y (F, 10 K).

Por microscopía electrónica de transmisión se observó que las membranas de las células de las raíces en ambos tipos de estrés están plasmolizadas (figura 9 B, C, E y F, la membrana plasmática está separada de la pared celular, señalada con una flecha en las microfotografías). Mientras que en las células de las raíces de las plantas control no se observa esta separación (figura 9 A y D).



**Figura 10.** Actividad de las ATPasas de H<sup>+</sup> de la fracción microsomal total de raíces de *L. esculentum* expuestas al estrés aleloquímico y al estrés hídrico. Letras diferentes son estadísticamente significativas Duncan ( $p < 0.05$ ).

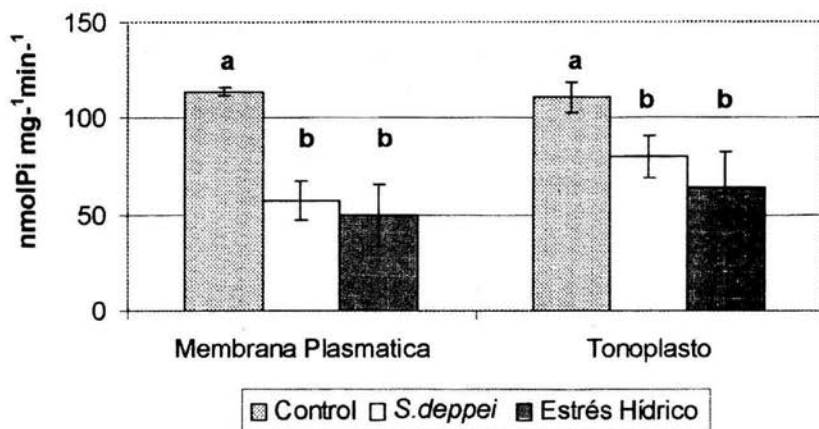
**Tabla 3.** Porcentaje de actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> en microsomas totales de raíces de *L. esculentum* expuestas al estrés aleloquímico y al estrés hídrico, con respecto al control.

Tratamiento	% actividad	% de inhibición en la actividad total
Control	100	0
Estrés aleloquímico	62	38
Estrés hídrico	41	59

La Figura 10 muestra el efecto inhibitorio del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre la actividad de las ATPasas de H<sup>+</sup> de la fracción microsomal total de las células



de la raíz de jitomate. La actividad de las ATPasas de  $H^+$  fué inhibida por el estrés aleloquímico 38% y 59 % por el estrés hídrico (Tabla 3).



**Figura 11.** Comparación del efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de membrana plasmática y la V-ATPasa de  $H^+$  del tonoplasto de raíces de *L. esculentum* ( $p < 0.05$ ).

Ambos tipos de estrés inhibieron significativamente la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de membrana plasmática y la V-ATPasa de  $H^+$  del tonoplasto. Los dos tipos de enzimas (MP y T) en conjunto, contribuyen a la homeostasis de la célula en relación al pH, iones, así como a la polarización de la membrana; lo que repercute en muchos procesos celulares: transporte, nutrición, división y elongación celular, y turgencia (Serrano, 1989; Heven, et. al. 1999).

Para determinar el daño oxidativo que el estrés hídrico y el aleloquímico causaban en las raíces de jitomate, se midió la presencia de radicales libres, la lipoperoxidación de membrana y la actividad de la enzima antioxidante catalasa (EC 1.11.1.6).

**Tabla 4.** Efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre la producción de radicales libres y la lipoperoxidación en raíces de *L. esculentum*. Se utilizaron 60 µg de proteína para determinar radicales libres y 500 µg para la lipoperoxidación.

Tratamiento	Radicales libres (cpm/µg)	Lipoperoxidación (Δ A <sub>233</sub> )
Control	46,400 ± 5,300 (a)	0.183 ± 0.010 (a)
Estrés aleloquímico	66,700 ± 9,900 (b)	0.270 ± 0.034 (b)
Estrés hídrico	31,400 ± 2,000 (c)	0.377 ± 0.016 (c)

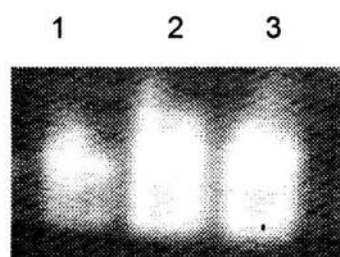
Se observó que en las células de raíz de jitomate expuestas al lixiviado con *S. depeei*, los niveles de radicales libres aumentaron significativamente un 40%, y la lipoperoxidación un 47% con respecto al control (tabla 7). En contraste, el estrés hídrico causó una reducción significativa del 68% en los niveles de radicales libres, mientras que la lipoperoxidación aumentó un 105% (tabla 7).



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
UNAM

## ACTIVIDAD DE LA CATALASA

La actividad de la catalasa se determinó tanto en geles de actividad como por espectrofotometría. Se observó que ambos tipos de estrés causaron un aumento en la actividad de ésta enzima, como se observa en la figura 12. La actividad de la catalasa aumentó 40% con el estrés aleloquímico y 81% en el estrés hídrico, en comparación a la actividad que presentó el control (Tabla 5).



**Figura 12.** Gel nativo de actividad de la catalasa de raíces de *L. esculentum* (carril 1) bajo estrés aleloquímico (carril 2) y bajo un estrés hídrico (carril 3).

**Tabla 5.** Efecto del estrés aleloquímico y del estrés hídrico sobre la actividad de la catalasa en raíces de *L. esculentum*. Se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína y la actividad se midió por la transformación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno molecular.

Tratamiento	Actividad de la catalasa ( $\text{nM mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
Control	$0.013 \pm 0.001$ (a)
Estrés aleloquímico	$0.018 \pm 0.001$ (b)
Estrés hídrico	$0.023 \pm 0.003$ (c)

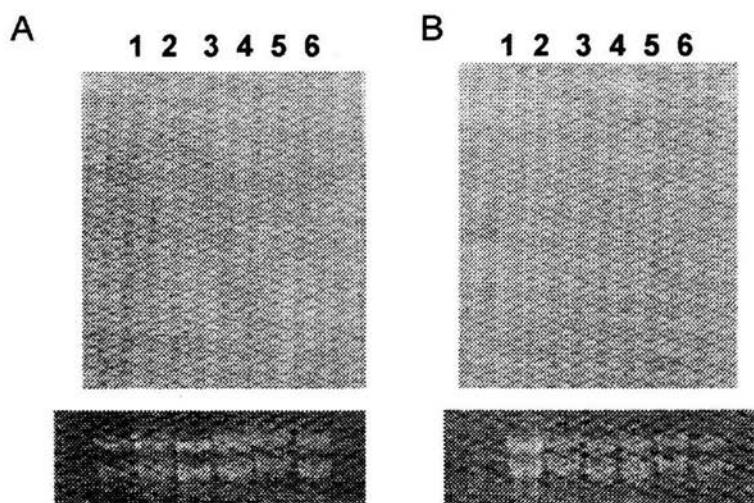
Letras diferentes son estadísticamente significativas. Duncan ( $p < 0.05$ )

**Tabla 6.** Resumen de los efectos sobre la actividad de las P-ATPasas de H<sup>+</sup> y de las V-ATPasas de H<sup>+</sup>, de la catalasa y de la producción de radicales libres y lipoperoxidación en raíces de *L. esculentum* expuestas a estrés aleloquímico y a estrés hídrico.

TRATAMIENTO	Estrés aleloquímico	Estrés hídrico
Radicales libres	↑(40%)	↓(68%)
Lipoperoxidación	↑(47%)	↑(105%)
Actividad de la catalasa	↑(40%)	↑(81%)
Actividad de P-ATPasa de H <sup>+</sup>	↓(50%)	↓(56%)
Actividad de V-ATPasa de H <sup>+</sup>	↓(28%)	↓(42%)

### EXPRESION DE GENES DE PROTEINAS LEA

La expresión de genes de las proteínas pLE4 y pLE25, fue analizada por Northern blots. Estos genes se expresan en condiciones de estrés hídrico y responden a la aplicación de ABA exógeno en plántulas de jitomate (Cohen, et. al. 1991)



**Figura 13.** Geles de RNA de raíz de jitomate y autorradiografías para los cDNA pLE4 (A) y el cDNA del pLE25 (B).

Las autorradiografías no mostraron ninguna señal de expresión de los genes de las proteínas pLE4 y pLE25. Este resultado negativo se pudo deber a que las raíces de jitomate de 72 h, no la expresan, o bien, que el RNAm sea de muy baja abundancia, y/o que el protocolo de marca 'no radioactiva' no haya sido lo suficientemente sensible para detectar los mensajeros de éstas proteínas.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que el crecimiento radicular del jitomate es inhibido significativamente por los aleloquímicos presentes en el lixiviado acuoso de *S. deppei* (0.5%). En estudios anteriores, se había observado que *S. deppei* inhibe el crecimiento radicular del frijol, maíz, chilacayote y algunas malezas como el pasto elefante y el amaranto (Hernández-Bautista, et. al. 1996; Cruz-Ortega, et. al. 1998; Romero-Romero, et. al. 2002). Sin embargo, el lixiviado de *S. deppei* no tiene efecto sobre la germinación de las especies de prueba. Por otra parte, el estrés hídrico (-0.328 MPa) inhibió la germinación significativamente en un 20% y el crecimiento de la raíz del jitomate 70% (en la misma proporción que el lixiviado de *S. deppei*). Los resultados de germinación concuerdan con un estudio en donde se germinaron semillas de jitomate silvestre y mutantes deficientes en ABA (sit<sup>w</sup>) bajo diferentes presiones osmóticas; los autores reportan que a -0.3 y -0.4 MPa la germinación en ambas variedades se inhibió un 20% y un 50% respectivamente (Hilhorst y Downie, 1995).

Las fotografías de microscopía de barrido (figura 7, 100X) muestran una inhibición en la zona de elongación de las raíces expuestas a los tratamientos. En estas mismas fotografías se puede observar, que las raíces con estrés aleloquímico presentan una mayor cantidad de pelos radiculares y con mayor longitud en comparación con las del control. Se ha reportado que aleloquímicos como el ácido ferulico (200 µM) inhiben la formación de pelos radiculares y la longitud de la raíz primaria de *Lactuca sativa* L. (Caspersen, et. al. 1999). Este mismo efecto se observó con el lixiviado acuoso de hojas de alfalfa, sobre el crecimiento de la raíz y la densidad de pelos radiculares de plántulas de la misma especie y del pasto elefante (Hedge y Millar, 1992). Estos trabajos muestran que los aleloquímicos, además de afectar el crecimiento normal de la raíz, también tienen un efecto sobre su morfología, en donde pueden o no impedir el desarrollo de pelos radiculares. Por el contrario, el estrés hídrico, inhibió tanto el crecimiento de la raíz como el desarrollo de los pelos radiculares (Figura 7). Este mismo efecto ha sido reportado en otros trabajos, por ejemplo Chiatante y col. (1999) observaron que bajo condiciones de estrés hídrico,

las raíces de chícharo y los vástagos de pino reducen su crecimiento, y además se inhibe el desarrollo de las raíces secundarias y de los pelos radiculares; estos autores sugieren que los meristemos son extremadamente sensibles al déficit hídrico.

En el presente estudio también se observó un engrosamiento en la zona meristemática de las raíces expuestas a los dos tratamientos (figura 8). Otros estudios han mostrado que los aleloquímicos, como el ácido cumárico y el lixiviado acuoso de hojas de alfalfa, causan un engrosamiento en el diámetro de las raíces de alfalfa (Chon, et. al. 2002). Otra investigación mostró que la cumarina inhibió completamente la elongación y la división celular, indicando que este efecto ocasionó el engrosamiento y un alargamiento anormal de las raíces (Abenavoli, et. al. 2001).

A nivel de ultraestructura, observamos una plasmólisis en las células de la periferia de la raíz expuesta a ambos tratamientos (figura 9). Esta plasmólisis fue más evidente en las células de las raíces expuestas al lixiviado de *S. deppei*. Un trabajo previo mostró que éste también causó la plasmólisis de células de la periferia en raíces de frijol (Cruz-Ortega, 1998). Esto indica que los aleloquímicos contenidos en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, causan un efecto perjudicial en las células al dañar la integridad de la membrana plasmática.

Con el objetivo de determinar el efecto de ambos factores de estrés, el aleloquímico y el hídrico, sobre la integridad de la membrana en las raíces de jitomate, se midió la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática y la V-ATPasa del tonoplasto. Einhellig (1995) ha propuesto que es improbable que los aleloquímicos del tipo fenólico actúen de una manera específica sobre un simple proceso celular, es más probable, que su efecto sea múltiple y que su acción sobre las membranas es la causa principal de la alteración de procesos, como la función normal de las proteínas transportadoras como las ATPasas de  $H^+$ , canales, acarreadores y vías de señalamiento.

Las membranas actúan como sensores del ambiente e inician cambios internos que conducen a respuestas metabólicas de la planta a los ambientes adversos (Hale y Orcutt, 1986). Las bombas de protones, la ATPasa de  $H^+$  y la V-ATPasas, son enzimas membranales que desempeñan muchas funciones importantes como son: la

regulación del potencial osmótico, la división y expansión celular y la compartimentación de iones, la cual se lleva a cabo a expensas del gradiente electroquímico (Serrano, 1989; Niu, et. al. 1993). Los estudios hechos sobre la expresión de los RNAm de las ATPasas de H y las V-ATPasas en células de fibras de algodón, mostraron que, tanto las bombas de protones de las vacuolas, como las de la membrana plasmática, están coordinadas durante la expansión celular (Heven, et. al. 1999). En este sentido, es importante el estudio de estas enzimas para poder determinar el efecto que el estrés aleloquímico y el hídrico tienen sobre su actividad y relacionarlo con el efecto que tienen sobre el crecimiento y otras actividades metabólicas que dependen de ellas.

Varios estudios muestran que la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> es inhibida por compuestos aleloquímicos. Cruz-Ortega y col. (1990) observaron que el diacetilpiperol de *Piqueria trinervia*, inhibe 67% la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y 31% la V-ATPasa de tonoplasto en raíces de *Ipomoea purpurea*. La resina glucosídica de *Ipomoea tricolor* inhibió 30% la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de raíces de *Echinochloa crus-galli* (Calera, et. al. 1995a). Friebe y col. (1997) observaron que el 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (0.25 mM) inhibió la ATPasa de H<sup>+</sup> de las raíces de *Avena sativa* y *Vicia faba*. Todos estos estudios sugieren que el resultado de la inhibición en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> está muy relacionado con la inhibición en el crecimiento de la raíz. Además de las ATPasas, los genes de otras proteínas como las acuaporinas  $\gamma$ -TIP y  $\alpha$ TIP (tonoplast intrinsic protein) se expresan por déficit hídrico, lo que indica que pudieran desempeñar un papel en el ajuste osmótico. En lo que respecta a la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup>, ésta también se ha observado que disminuye cuando existe un estrés hídrico en la planta. Por ejemplo, Qiu y Zhang (2000), observaron una disminución en la actividad de ésta enzima en hipocótilos de soya y demostraron que se afecta la desfosforilación del carboxilo terminal el cual presenta varios sitios potenciales de fosforilación.

Otro aspecto importante para conocer el daño a nivel de membrana es la producción de radicales libres generados durante un factor adverso. Se sabe que los radicales



libres son formados durante varios tipos de estrés como el hídrico y el aleloquímico (Scandalios, 2002; Cruz-Ortega, et. al. 2002). En éste trabajo se muestra que el estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *S. deppei* genera la producción de radicales libres, aumentando sus concentraciones básicas, sin embargo, esto no se observó en las raíces sometidas al estrés hídrico; en este último los radicales libres estuvieron por debajo de sus concentraciones básicas. En este caso, las concentraciones de RL por arriba o por abajo de las básicas, son dañinas para la célula, porque el aumento de éstos causa una lipoperoxidación y su disminución ocasiona daños en las rutas de señalamiento donde están implicados como segundos mensajeros. Se ha visto que los RL pueden participar en la regulación de las fosfatasa-cinasas y activar los factores de transcripción que responden al estrés (Das, et. al. 1999; Mittler, 2002). Las raíces de jitomate expuestas al estrés aleloquímico y al estrés hídrico mostraron 50 y 100% más lipoperoxidación (respectivamente) con respecto al control, lo que sugiere un daño en las membranas ocasionado por los RL que se generan por ambos factores de estrés. Cruz-Ortega y col. (2002) encontraron que el lixiviado acuoso de *Callicarpa acuminata*, aumenta la cantidad de radicales libres y la lipoperoxidación en células de raíces de jitomate, concluyendo que en las células de la raíz se genera un estrés oxidativo provocado por los metabolitos secundarios del lixiviado. Debido a la lipoperoxidación la membrana pierde su fluidez, ocasionando a su vez que la actividad y las funciones receptoras de las proteínas membranales se vea afectada, i.e. las ATPasas tipo P y V. Si el daño es muy severo, se puede ocasionar la lisis de la célula.

Para confirmar que en las raíces de jitomate expuestas a los dos factores se estaba generando un estrés oxidativo, se midió la actividad de la catalasa, como modelo de enzima antioxidante. La actividad de la catalasa en raíz de jitomate aumentó significativamente en los dos tratamientos, lo que sugiere que los dos factores causaron un incremento en los niveles de  $H_2O_2$ . Estos resultados coinciden con otros trabajos en donde se observó que la actividad de la catalasa aumenta, por ejemplo, con el lixiviado acuoso de *C. acuminata* en raíces de jitomate (op.cit), con el ácido ferúlico en plántulas de maíz (Devi y Prasad, 1996b) y con el ácido benzoico en

cotiledones de pepino (Maffei, et. al. 1999). Aunque en otros trabajos se muestra que la actividad de la catalasa disminuye por efecto del ácido benzoico y el ácido cinámico en raíces de soya (Baziramakenga, et. al. 1995). Como podemos ver los mecanismos de acción de los aleloquímicos son muy variables, porque dependen de su concentración, de la sensibilidad de la especie y del estado de desarrollo de la planta prueba.

Durante el estrés hídrico se ha observado que la actividad de la catalasa también aumenta. Por ejemplo, Bandurska (2002) encontró que la catalasa y la guaiacol peroxidasa incrementaron su actividad en dos variedades de avena (Aramir y R567); mientras Jiang y Zhang (2002) observaron que en plántulas de maíz se incrementa la actividad de la catalasa y de otras enzimas antioxidantes; los dos autores concluyen que la desintoxicación del  $H_2O_2$  bajo estrés hídrico se debió a la acción de estas enzimas.

Existen varias respuestas al estrés que pueden ser consideradas comunes en las plantas, por ejemplo, las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión reductasa son probablemente muy importantes en la tolerancia a factores de estrés. Es importante resaltar que la catalasa puede ser la responsable de remover el exceso de peróxido de hidrógeno generado durante un estrés (Mittler, 2002).

Las plantas responden a diversos factores de estrés utilizando su información genética. En este trabajo se puso en evidencia que el estrés aleloquímico e hídrico pueden dañar los mismos sistemas enzimáticos (i.e. catalasa, ATPasa de membrana plasmática y de tonoplasto) y membranales (lipoperoxidación), de forma particular. Aunque la actividad de la ATPasa de  $H^+$  fue inhibida por ambos factores, el estrés hídrico fue el que mayor efecto inhibitorio tuvo. Por otro lado, la formación de radicales libres fue muy diferente en ambos tipos de estrés, mientras que la lipoperoxidación fue mayor en el estrés hídrico. Sin embargo, la actividad de la catalasa aumentó significativamente en ambos tratamientos, siendo mayor en el estrés hídrico, lo que explicaría la disminución de radicales libres.

Por último, es necesario considerar que aunque los dos factores de estrés son de naturaleza distinta, los resultados muestran que ambos afectan algunos procesos

celulares en común y ocasionan un daño similar. Como se ha mencionado anteriormente, no se conocen con detalle los mecanismos de acción del estrés aleloquímico, ya que son muchos los blancos moleculares que pueden afectar. Por otro lado, en el estrés hídrico ya se conocen algunos mecanismos de acción y vías de señalamiento aunque no están totalmente esclarecidos (Schroeder, et. al. 2001). Se ha observado, que durante un déficit hídrico, hay un aumento significativo de los niveles de ABA en las raíces (Jia y Zhang, 2000), el cual se transporta hacia las hojas, en donde regula el cierre de los estomas para evitar la pérdida de agua. En las células guarda, el ABA al unirse a un receptor puede causar, el aumento de ROS (a través de la NADPH oxidasa) o bien la liberación de IP3 (por la PLC), los cuales van a activar a los canales de  $Ca^{2+}$ , tanto de la membrana plasmática como del tonoplasto, los niveles altos de calcio causan la apertura o cierre de canales de  $K^+$  y  $Cl^{2-}$  e inhiben la actividad de las ATPasas, todos estos señalamientos dan como resultado el cierre de los estomas (Zhang, et. al. 2001; Taiz y Zeiger, 2002). Con lo que respecta al estrés aleloquímico, Holapa y Blum (1991) reportan que en plantas tratadas con ácido ferúlico, aumentan los niveles de ABA. Este aumento de ABA pudiera activar rutas de señalamiento que inducen, la disminución de la conductancia estomatal (Klein y Blum, 1990), el cierre de estomas (Purohit, et. al. 1991) y la despolarización de la membrana (Moreland y Novitzky, 1987), que han sido estudiados por diferentes autores como mecanismos de acción del estrés aleloquímico, y que son comunes a los que se observa durante el estrés hídrico. Hasta el momento se desconocen las vías de señalamiento del estrés aleloquímico, y el único elemento en común que pudieran tener los dos factores es el aumento del ABA, la cual es considerada como una hormona de respuesta al estrés (Taiz y Zeiger, 2002). Por todo lo anterior, es necesario profundizar más en el estudio de los mecanismos de señalamiento de los compuestos aleloquímicos, y su posible interacción con otros factores de estrés.

## CONCLUSIONES

El lixiviado acuoso de *S. deppoi* tiene un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radicular de jitomate.

La raíz de jitomate expuesta al estrés aleloquímico presenta cambios morfológicos importantes como el grosor y el aumento en pelos radiculares.

En el estrés hídrico la raíz presenta también un engrosamiento, pero no hay presencia de pelos radiculares

Las células de la periferia de las raíces de jitomate expuestas al estrés aleloquímico y al estrés hídrico se encuentran plasmolizadas.

La actividad de las ATPasas totales, en raíces de jitomate, fue inhibida significativamente por los dos tratamientos; en mayor grado por el estrés hídrico. La actividad de las ATPasas de  $H^+$  de la membrana plasmática y del tonoplasto se inhibe significativamente en los dos tratamientos.

Los radicales libres aumentan durante el estrés aleloquímico 40% y disminuyen 32% en el estrés hídrico.

La lipoperoxidación fue aumentada en los dos tratamientos y es mayor en el estrés hídrico.

La actividad de la catalasa se incrementa en los dos tratamientos y es mucho mayor en el estrés hídrico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., Niu, X., Singh, N. K., Hasegawa, P. M. y Versan, R. A. 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*. 118 (1): 11-23.
- Abenavoli, M. R., De Santis, C., Sadari M., Sorgona, A., Badiani, M. y Cacco G. 2001. Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat. *New Phytologist*. 150 (3): 619-627
- Abraham, D., Braguini, W. L., Kelmer-Bracht, A. M. y Ishii-Iwamoto, E. L. 2000. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.* 26 (3):611-624.
- Aguilar, A. Camacho, J. R. Chino, S. Jácquez, P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social información etnobotánica. México. IMSS. 253 pp.
- Anaya, A. L. y Pelayo-Benavides, H. R. 1997. Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae): Effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy Journal* 4 (1): 57-68.
- Anderson, M. D., Prasad, K. T. y Stewart, C. R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1257.
- Ayvar, S. S., Sosa-Moss, C., Rosas, R. M. y Villareal G. L. A. 1994. Compendio de enfermedades de algunos cultivos de México. Serie Sanidad Vegetal, SARH. 165-176
- Baker, J., Steele C. y Dure, L. 1988. Sequence and characterization of 6 lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11:277-291
- Bandurska, H. 2002. The effect of water deficit on the activity of hydrogen peroxide scavenging enzymes in two barley genotypes. *Acta. Soc. Bot. Pol.* 71 (4):307-310.

- Baziramakenga, R., Leroux, G. D. y Simard, R. R. 1995. Effects of benzoic and cinnamic-acids on membrana-permeability of soybean roots. *J. Chem. Ecol.* 21(9):1271-1285.
- Baziramakenga, R., Leroux, G. D., Simard, R. R. y Nadeau, P. 1997. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. *Can. J. Bot.* 75: 445-450
- Beers, F. R. y Sizer, I. W. 1952. A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140.
- Berg, B. 1986. The influence of experimental acidification on nutrient release and decomposition rates of needle and root litter in the forest floor. *For. Ecol. Manage.* 15: 195-213.
- Bolwell, G. P. y Wojtaszek, P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defenses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:347-366.
- Bowler, C., Montagu, M. V. y Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Bowler, C., Van. C. W., Van M. M. y Inze, D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:199-218.
- Bradford, M. R. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bray, A. E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Bray, A. E. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2 (1): 48-54.
- Bray, A. E., Bailey-Serres, J. y Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, Buchanan, B., W. Gruissem, y Jones, R. Eds. American Society of Plant Physiologist, Rockville, M. D. 1158-1203.
- Blum, U. y Dalton, B. R. 1985. Effects of ferulic acid and allelopathic compound on leaf expansion of cucumber seedlings grown in nutrient culture. *J. Chem. Ecol.* 11 (3): 279-301.

- Briskin, D. P. y Hanson, J. B. 1992. How does the plant plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase pump protons? *J. Exp. Bot.* 43:269-289.
- Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, M.D.
- Cadenas, E. y Helmut, S. 1984. Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods in Enzymology* 105:221-231.
- Calera, M. R., Anaya, A. L. y Gavilanes-Ruiz, M. 1995a. Effect of phytotoxic resin glucoside on activity of H<sup>+</sup>-ATPase from plasma membrane. *J. Chem. Ecol.* 21(3): 289-297.
- Calera, M. R., Mata, R., Anaya, A. L. y Lotina-Hennsen, B. 1995b. 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'4'-dihidroxi-4-fenilcumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research* 0:1-6.
- Calera, M. R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B. y Anaya, A. L. 1996. Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: Structure-activity relationships. *J. Agric food Chem.* 44: 2966-2969.
- Caspersen, S., Sundin, P., Munro, M., Athalsteinsson, S., Hooker, J. E. y Jensen P. 1999. Interactive effects of lettuce (*Lactuca sativa* L.) irradiance, and ferulic acid in axenic, hydroponic culture. *Plant and Soil* 210 (1): 115-126.
- Chary, P. y Natving, D. O. 1989. Evidence for tree differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol* 171:2646-2652
- Chiatante, D., Iorio, A. D., Maiuro, L. y Scippa, S. G. 1999. Effect of water stress on root meristems in woody and herbaceous plants during the first stage of development. *Plant and Soil* 217: 159-172.
- Chon, S. U., Choi, S. K., Jung, S., Jang H. G., Pyo, B.S. y Kim, S. M. 2002. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection* 21 (10): 1077-1082.

- Close, T. J., Kortt, A. A. y Chandler, P. M. 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant. Mol. Biol.* 13:95-108.
- Close, T. J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant.* 97:795-803.
- Cohen, A., Plant A. L., Moses, S. M. y Bray E. A 1991. Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato. *Plant Physiol.* 97:1367-1374.
- Cronquist A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants.* Columbia University Press. New York. 1262pp
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L. y Ramos, L. 1988. Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watermelon. *J. Chem. Ecol.* 14: 71-86
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L., Gavilanes-Ruiz, M., Sanchez, N. S. y Jimenez, E. N. 1990. Effect of diacetyl piguerol on H<sup>+</sup>ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*. *J. Chem. Ecol.* 16(7): 2253-2261.
- Cruz-Ortega R., Anaya, A L., Hernández-Bautista, B. E. y Laguna-Hernández, G. 1998. Effects of Allelochemical stress Produced by *Sicyos deppei* on Seedling Root Ultraestructura of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *J. Chem. Ecol.* 24 (12): 2039-2057.
- Cruz-Ortega R., Ayala-Cordero, G. y Anaya, A. L. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiol Plantarum.* 116: 20-27.
- Das, D. K., Maulik, N., Sato, M. y Ray, P. S. 1999. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heat. *Molecular Cell Biochemistry* 196: 59-67.
- Devi, S. R. y Prasad M. N. V. 1996a. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biol. Plant.* 38 (3): 387-395.



- Devi, R. S., Pellissier F. y Prasad, M. N. V. 1996b. *Allelochemicals*. Prasad, M. N. V. (Ed). Plant Ecophysiology. Jonh Wiley & Sons. Inc. New York. 253-304.
- Drose, S., Bindseil, K. U., Bowman, J. E., Siebers, A., Zeeck, A. y Altendorf, K. 1993. Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry*. 32:3902-3906
- Dschida, W. J. K. y Bowman, B. J. 1995. The vacuolar ATPase sulfite stabilization and the mechanism of nitrate inactivation. *J. Biol. Chem.* 270: 1557-1563
- Dure, L. 1993. A repeating 11-mer aminoacid motif and plant desiccation. *Plant J.* 3:363:369.
- Einhellig, F. A., Stille, M. y Schon, M. K. 1985. Effects of allelochemicals on plant-water relationships. *The Chemistry of Allelopathy*. (Ed.) Thompson, A. C. American Chemical Society. Washington, DC. 268: 179-195
- Einhellig, F. A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. En: *The Science of Allelopathy*. Eds. Putnam, A. R. y Tang C-S. John Wiley & Sons, Inc. USA. 171-188.
- Einhellig, F. A. 1987. Interactions among allelochemicals and other stress factors of the plant environment. *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. Ed. Waller, G.R. American Chemical Society. Washington, DC. 330: 343-357.
- Einhellig, F. A. 1995. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In *Allelopathy, Organisms, Processes and Applications*. USA 96-116.
- Einhellig, F. A. 2002. The Physiology of allelochemical action clues and views. In *Allelopathy from molecules to ecosystems*. Ed. Science Publishers. Inc. USA 1-23.
- Flores-Carmona, M. C. 2003. Potencial de Bioactividad de algunas especies arbóreas de la reserva natural El Edén, Quintana Roo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Foyer, C. H., Descourvieres, P. y Kunert K. J. 1994. Protection against oxigen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523

- Friebe, A., Roth, U., Kuck, P., Schnabl, H. y Schutz, M. 1997. Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Phytochemistry*. 44 (6): 979-983.
- Galleger, S. R. y Leonard, R. T. 1982. Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatasa activities of corn roots, *Plant Physiol*. 60:1335-1340.
- Gershenson, J. 1993. *Insect-plant interactions*. Ed. Bernays, E. A. CRC Press, Boca Raton, FL. 105-173
- Godoy J. A., Luna R., Torres-Schumann S., Moreno J., Rodrigo R. M. y Pintor-Toro J. A. 1994. Expression, tissue distribution and subcelular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1921-1934
- 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.
- Grandmougin, A., Benveniste, P. y Hartmann, M. A. 1989. Effect of sterols on reconstituted plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase from maize roots. En *Plant Membrane Transport. The Current Position*. Ed Dainty, J., De Michelis, M., Marre, I. y Rasi-Caldongo F. 113-114.
- Grant, J. J. y Loake, G. J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*. 124:21-29.
- Hale, M. G. y Orcutt, D. M. 1987. *The physiology of plants under stress*. John Wiley, NY. 206 pp.
- Halliwell, B. y Gutteridge. J. M. C. 1989. *Free radicals biology and medicine*. Clarendon, Press Oxford. 543 pp.
- Harris, H. y Hopkinson, D. A. 1976. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. 1-2 pp.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu J. K. y Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:463-99.
- Hedge, R. S. y Miller, D. A. 1992. Scanning electron microscopy for studying root morphology and anatomy in alfalfa autotoxicity. *Agron. J.* 84:618-620.

- Hernández-Bautista, B. E., Torres-Barragán, A. y Anaya A. L. 1996. Evidences of allelopathy in *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae). Resúmenes del First World Congress on Allelopathy. Universidad de Cadiz. International Society of Allelopathy. (IAS) p. 91.
- Herrig, V., De Lourdes, M., Ferrarese, M.D.L., Susuki, L. S., Rodriguez, J. D. y Ferrarese, O. 2002. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. *Biological Research*. 35 (1): 56-66.
- Heven S., Xuhang L. y Palmgren, M. G. 1999. Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup> pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell*. 11:677-689.
- Hilhorst, H. W. M. y Downie, B. 1995. Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Moneymaker): studies with the sitiens mutant. *J. Exp. Botany*, 47 (294): 89-97
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. y Sussman M. R. 1998. A role for the AKT 1 potassium channel in plant nutrition. *Science*. 280: 918-921.
- Holappa, L. D. y Blum, U. 1991. Effects of exogenously applied ferulic acid a potential allelopathic compound on leaf growth water utilization and endogenous abscisic acid levels of tomato cucumber and bean. *J. Chem. Ecol.* 17 (5): 865-886.
- Ingram J. y Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:377-403.
- IAS (International Allelopathy Society). Constitution and Bylaws. First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future Cadiz, Spain. September 1996.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., Arrese-Igor, C. y Becana, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol* 116: 173-181.

- Jabcosen, A. y Corcoran, M. R. 1977. Tannins as Gibberellin antagonists in the synthesis of  $\alpha$ -amylase and acid phosphatase by barley seeds. *Plant. Physiol.* 59: 129-133.
- Jia, W. y Zhang J. H. 2000. Water stress-induced abscisic acid accumulation in relation to reducing agents and sulfhydryl modifiers in maize plant. *Plant Cell and Environment.* 23:1389-1395.
- Jiang, M. y Zhang, J. H. 2002. Role of abscisic acid in water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Rad. Res.* 36 (9):1001-1015.
- Kaloo, G. 1993. Tomato, *Lycopersicon esculentum* Miller. En: Genetic Improvement of Vegetable Crops, ed. Kaloo, G. y Bergh, B.O. Pergamon Press, Oxford, U. K. 645-646pp
- Klein, K. y Blum, U. 1990. Inhibition of cucumber leaf expansion by ferulic acid in split-root experiments. *J. Chem. Ecol.* 16 (4): 455-463
- Kohashi-Shibata, J., Zepeda, A. S. y Gómez, A. J. R. 1990. Crecimiento, floración y fructificación de la maleza *Sicyos deppei* G. Don chayotillo (Familia Cucurbitaceae) *Agrociencia Serie Fitotecnia.* 1:11-26.
- Knight, H. y Knight, M. R. 2001. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Science.* 6: 262-267
- Klessig, D.F., Durner, J. Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D. Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. y Silva, H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:8849-8855.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambers, H., Chapin III, F. S. y Pons, T. L. 1998. *Plant Physiological Ecology.* Springer-Verlag, New York.
- Larcher, W. 1995. *Physiological plant ecology.* Ed. Springer. Germany. 321-447.
- Li, H. H., Inoue, M., Nishimura, H., Mizutani, J. y Tsuzuki, E. 1993. Interactions of trans cinnamic acid its related phenolic allelochemicals and abscisic acid in

- seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* 19 (8): 1775-1787.
- López-Huertas, E., Charlton W. L., Johnson, B., Graham, I. A. y Baker A. 2000. Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19:6770-6777.
- Madhavi, D. L. y Salunkhe, D. K. 1998. Tomato. En: Handbook of vegetable science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing, Ed. Salunkhe, D. K. Kadam S. S. y Marcel Dekker, Inc. N.Y. 171-201 pp.
- Maeshima, M. 2001. Tonoplast Transporters: Organization and Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 469-497.
- Maffei, M., Berteà, C. M., Gameri, F. y Scannerini, S. 1999. Effect of benzoic acid hydroxy-and methoxy- ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. Isocitrate lyase and catalase activity. *Plant Science* 141:139-147
- Marre, E. 1979. Integration of solute transport in cereals. *Recent Advances in the Biochemistry of cereals*, Ed. Laidman, D. L. Wyn Jones, New York: Academic Press. 3-25.
- Martiny-Baron, G. y Scherer, G. F. E. 1989. Phospholipid-stimulated protein kinase in plant. *J. Biol. Chem.* 264: 08052-18059.
- Matsuoka, K., Higuchi T., Maeshima, M. y Nakamura, K. 1997. A vacuolar type H<sup>+</sup> ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell.* 9:533-546.
- Memon, A. R. y Boss, W. F. 1990. Rapid light induced changes in phosphoinositide kinases and H<sup>+</sup> ATPase in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 265: 14187-14821.
- Messiaen, C. M. 1975. Las Hortalizas. Ed. Blume. México, D.F. 455 pp
- Mittler, R. y Zilinskas, B. A. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5(3): 397-405.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science.* 7(9):405-410
- Moreland, D. F. y Novitzky, W. P. 1987. Effects of phenolic acids, coumarins, and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. En: Allelochemicals, role

- in agriculture and forestry. Ed. Waller G. R. American Chemical Society. Washington, DC. 330: 247-261.
- Mucciarelli, M., Camusso, W., Berteza, C. M., Bossi, S. y Maffei, M. 2001. Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry*. 57 (1): 91-98.
- Niu, X., Zhu, J-K., Narasimhan, M. L., Versan, R. A. y Hasegawa, P-M. 1993. Plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta*. 190:433-438.
- Noctor, G. y Foyer, C. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Orozco-Segovia, A., Brechú-Franco, A. E., Zambrano-Polanco, L., Osuna Fernández, R., Laguna Hernández, G. y Sánchez-Coronado M. E. 2000. Effects of maternal light environment on germination and morphological characteristics of *Sicyos deppei* seed. *Weed Research*. 40: 495-506.
- Palma, J. M., Garrido, M., Rodríguez-García, M. I. y del Rio, L. A. 1991. Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 287:68-74.
- Palmgern, M. G. y Harper, J. F. 1999. Pumping with plant P-Type ATPases. *J. Exp. Botany*. 50:883-893.
- Palmgern, M. G. 1991. Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Physiol Plant* 83:314-323.
- Palmgern, M. G. 2001. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.
- Parets-Soler, A., Pardo, J. M. y Serrano R. 1990. Immunocytolocalization of plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase. *Plant Physiol.* 93:1654-58.
- Pfeiffer, W. 1995. Effects of W-7, W-5, verapamil and diltiazem on vacuolar proton transport. Comparison of vacuolar H<sup>+</sup>ATPase and H<sup>+</sup>Ppase from roots of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 94: 284-290.
- Post, R. L., Hegyvary, C. y Kume, S. 1972. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol. Chem.* 247:6530-40.

- Purohit, S., Laloraya, M. M. y Bharti, S. 1991. Effect of phenolic compounds on abscisic acid-induced stomatal movement: structure-activity relationship. *Physiol Plant* 81: 79-82.
- Qiu, Q.S. y Zhang, N. 2000. Water stress inhibits p-nitrophenyl phosphate hydrolysis activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from soybean hypocotyls. *Aus. J. Plant Physiol.* 27 (7):717-721.
- Rasmussen, J. A. y Einhellig, F. A. 1979. Inhibitory effects of combinations of three phenolic acids on grain sorghum germination. *Plant. Sci. Lett.* 14: 69-74.
- Ratajczak, R. 2000. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase. *Biochem et Biophys Acta.* 1465: 17-36
- Recknagel, R. O. y Glende E. A. 1984. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in Enzymol.* 105: 331-337.
- Rice, E. L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed., Academic Press, London 422 pp.
- Rodríguez-Jimenez, C. 1985. Cucurbitaceae. En. J. Rzedowski, J y Rzedowski, G.C. Eds. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Vol II ENCB Instituto de Ecología, IPN, México 415-422 pp
- Rojas, R. T. 1983. La Agricultura Chinampera. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 57-59.
- Romero-Romero, T., Anaya, A. L. y Cruz-Ortega, R. 2002. Screening for effects of phytochemical variability on cytoplasmic protein synthesis pattern of crop plants. *J. Chem. Ecol.* 28 (3):617-629.
- Sachs, M. M. y Ho, T-H. D. 1986. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:363-376.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring. New York.
- Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, F., Carballo, A., Rodríguez-Sotres, R. y Gavilanes-Ruíz, M. 1997. Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiol Plantarum* 101:157-164
- Santos, D. M. S. y Ochoa, A. N. 1990. Adaptación de las plantas al déficit hídrico. *Ciencia.* 41: 333-344

- Scandalios, J. G. 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (9): 483-486
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M. y Allen, G. J. 2001. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410: 327-330
- Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:61-94.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:161-167.
- Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, O., Larsson, L., Oecking, C. y Sommarin, M. 1999. Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant. Cell.* 11:2379-2391.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. 690pp
- Tyerman, S. D., Hohnert, H. J., Maurel, C. y Smith, J. A. C. 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* 50: 1055-1071.
- Urzúa, S. F. 1993. Control químico del chayotillo (*Sicyos deppei*) y avena loca (*Avena fatua*) en trigo de verano en Cuahuttlapan, Edo. de México. Memorias XIV Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Puerto Vallarta Jalisco.
- Vainshtein, B. K; Melik-Adamyán, W. R; Barynin, V. V; Vagin, A. A; Grebenko, A. I; Borisov, V. V; Bartels, K. S., Fita, I. y Rossmann, M. G. 1986. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 188:49-61
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42: 579-620
- Vilardell, J., Goday, A., Freire, M. A., Torrent, M., Martínez, C., Tome, J. M. y Pages M. 1990. Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB- 17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14: 423-432.



Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W. y Song, C-P. 2001.  
Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in  
*Vicia faba*. *Plant Physiol* 126: 1438-1448.