

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL ESTRÉS ALELOQUÍMICO
PRODUCIDO POR *Sicyos deppei* y
Zuelania guidonia, SOBRE LA EXPRESIÓN
GENÉTICA Y EL DAÑO OXIDATIVO EN
Phaseolus vulgaris L.

T E S I S

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

P R E S E N T A
BIOL. MARÍA ANTONIA MOTA BLANCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
DRA. ROCIO CRUZ ORTEGA

MEXICO, D.F.

Agosto, 2004



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.

Agradecimientos

A la *Dra. Ana Luisa Anaya*, por permitirme forma parte del laboratorio, por todo el tiempo dedicado a este trabajo y por ser una persona a quien admiro mucho.

No tengo palabras para agradecer a la *Dra. Rocio Cruz Ortega*, por todo su tiempo, disponibilidad, paciencia y ayuda para le realización de este trabajo y por mostrarme el maravilloso mundo vegetal.

A la *Dra. Sobeida Nieto*, por las correcciones que enriquecieron este trabajo y por la disponibilidad que siempre tuvo cuando le solicite su ayuda.

A la *Dra. Patricia Jato* por la revisión y cometarios de esta tesis

A la *Dra. Alma Orozco*, por sus acertadas sugerencias a este trabajo

A la *UNAM*, por haberse convertido en mi casa por tanto tiempo, especialmente a las instalaciones de la *Facultad de Ciencias* y los *Institutos de Fisiología y Ecología*.

Gracias a los apoyos económicos recibidos por parte del programa de becas para estudios de posgrado CONACYT.

A los *Profesores de la Maestria*, por mostrarme el universo celular de una forma muy especial.

Al laboratorio 204 sur del Instituto de Fisiología especialmente al *Dr. A. Zentella, Jose Luis y Adriana*, porque este trabajo también es parte de ellos.

Dedicatorias..

Dedico este trabajo especialmente a mis *Padres* porque este es el resultado de tantas ausencias y llegadas tarde a casa, por todo el apoyo, la confianza y el amor que me han brindado en cada momento de mi vida.

A *Susy, Andrea, Ricardo, Pablo A., Erick, Alejandra y Angel*
por la alegría que me brindan con su inocencia y amor

A mis *Herman@s*, por ayudarme ser cada día mejor

A mis *cunad@s*, porque son una parte muy importante en mi vida y
por creer en mi

A Mi *Tia Pola y Viky*, por ser el complemento de mi familia y por
toda su ayuda.

Gracias..

Aurora F. Por todo el apoyo mostrado en cada uno de los momentos que lo requerí, sus palabras de aliento las cuales me permitieron seguir adelante, su amistad y su buen humor. A mis grandes amigas *Sandra y Erika* por toda su ayuda, sus consejos y cariño. A *Alejandra S.* porque su amistad me ha permitido ser mejor. A *Carmen F.* por su paciencia, su amistad y la tranquilidad que emana a cada momento. A la *M. C. Teresa Romero*, por la ayuda en los trabajos de laboratorio, su apoyo, su risa contagiosa y sus consejos. A *Blanca* por el papel tan importante que desarrolla en el laboratorio, su apoyo y por ser una gran persona. A *Josefina*, porque siempre esta cuando la necesito. A *Patricia G.* por ser un gran apoyo en mi vida y por su amistad. A *Juan Fer, Gaby y Abis* por ser mis amigos y mis cómplices. A *Lety, Ivon, Hilda y Noemi*, por todo el tiempo compartido en la Biblioteca de IFC y enseñarme una novedosa forma de estudiar Biología Molecular. A *Carlos C.* porque a pesar de la distancia, seguimos siendo los mejores amigos. A mis compañeros de laboratorio *Hutzi, Mariana, Maribel, Jose, Fernando, Miguel e Ivan*, por hacer de mi estancia en el laboratorio una gran aventura. A la *Sra. Lupita*, por todos los consejos y los jalones de orejas dados a tiempo. A la *Familia Ruiz Martínez*, por ser personas a quien quiero y admiro mucho. A *Adrenalina, Dra. Lucero R. y Adelaida*, por mostrarme esa otra cara de trabajar para el Gobierno. A los *Yocoyanis*, por los gratos momentos en tardes sabatinas, la sonrisas y el buen humor. A mis compañer@s de la *COFEPRIS* porque hacen una grata estancia en las horas de trabajo. A mis compañeras de danza, *Olivia, Jazmin, Maru y Yolis*, porque hicieron de esa actividad mi mejor terapia. Y mil gracias *Alejandro*, por su amistad, por todo su apoyo, sus consejos y porque su presencia me ha permitido ser una mejor mujer.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
1. ALELOPATÍA Y METABOLISMO SECUNDARIO.....	6
1.1 Definición de Alelopatía	7
1.2 Metabolitos Secundarios (MS).....	7
1.3 Clasificación Ecológica de los Metabolitos Secundarios	8
1.4 Clasificación Química de los Metabolitos Secundarios	8
1.5 Modo de Liberación de los MS ó Aleloquímicos.....	9
2. MODOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS SOBRE LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS DE LAS PLANTAS.....	13
2.1 Efecto de algunos aleloquímicos sobre la división y elongación celular.....	13
2.2 Efecto sobre la actividad enzimática	13
2.3. Efectos sobre la Respiración Celular.....	14
2.4. Efectos sobre la Membrana Plasmática.....	14
2.5 Fotosíntesis.....	15
2.6 Efecto sobre los Ácidos Nucleicos	15
3. EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS	16
3.1 Mecanismos de resistencia al estrés	18
3.2. Los genes del estrés	18
3.3. Proteínas de choque térmico.....	20
3.4 LEA, Proteínas Abundantes de la Embriogénesis Tardía	20
3.5 Proteínas Transferidoras de Lípidos, PTLs:	23
4. ESTRÉS OXIDATIVO.....	24
5. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....	25
6. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES	27
6.1 Sistema no Enzimático.....	27
6.2 Sistema Enzimático	28
ANTECEDENTES.....	29
HIPOTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA DEL MATERIAL VEGETAL	32
<i>Zuelania guidonia</i>	32
<i>Sicyos deppei</i>	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	36

2. BIOENSAYOS in vitro	36
2.1 Despliegue diferencial (DD-RT-PCR)	37
3. EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO	42
4. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS, Pvltp-24 Y DE EMBRIOGENESIS TARDIA Pvlea-18	43
5. ACTIVIDAD DE LA CATALASA, RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACIÓN	46
5.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.	46
5.2. MEDICIÓN DE RADICALES LIBRES	48
5.3 PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA	49
RESULTADOS	50
1. BIOENSAYOS in vitro	50
2. EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO	50
2.1. EFECTO SOBRE EL ÁREA FOLIAR DEL FRIJOL	51
2.2 EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TALLO Y DE LA RAÍZ DEL FRIJOL	51
2.3 EFECTO SOBRE LA BIOMASA	53
3. ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA CLONA Pvltp-24	54
4. ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA CLONA Pvlea-18	55
5. EFECTO DE LOS LIXIVIADOS ACUOSOS DE <i>Sicyos deppei</i> y <i>Zuelania guidonia</i> , SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA, EN RAIZ, TALLO Y HOJAS DE <i>Phaseolus vulgaris</i>	56
DISCUSIÓN	59
BIOENSAYOS IN VITRO.	59
EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO	60
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS.	62
Proteínas de transferencia de lípidos.	62
Proteínas de embriogénesis tardía LEAs.	63
ESTRÉS OXIDATIVO	64
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	69

ABREVIATURAS

CSPD Sustrato quimiolumincente de fosfatasa alcalina

DEPC Dietil pirocarbonato

DTT Ditioneitol

EDTA Acido etilendiamino tetraácetico

LEA Proteinas de la embriogenesis tardía

LTP Proteína transportadora de lípidos

MOPS (3-[N-morfolino] ácido propanosulfónico

ROS Especies reactivas de oxígeno

SSC Citrato de sodio salino

TBE Amortiguador de tris boratos de EDTA

Tween 20 Polioxietileno sorbitan monolaurato

XGal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D galactosa

RESUMEN

En este trabajo se describen los efectos sobre el frijol (*Phaseolus vulgaris* L) del estrés aleloquímico causado por: 1) los lixiviados acuosos de la parte aérea de dos plantas alelopáticas, *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) y *Zuelania guidonia* (Flacourtiaceae) y 2) por la descomposición en el suelo de la parte aérea seca de estas especies en macetas con plántulas de frijol. Los efectos de (1) se probaron *in vitro* sobre semillas de frijol, utilizando bioensayos en cajas de petri, en los cuales se midió el crecimiento radicular de esta planta y su patrón de expresión de genes, utilizando la técnica del despliegue diferencial (DDRT-PCR). Los efectos de (2) se evaluaron mediante un experimento en el invernadero con macetas donde la parte aérea seca de las dos plantas alelopáticas se incorporó al suelo donde se transplantaron plántulas de frijol. En este experimento se midió el efecto de la descomposición sobre el crecimiento, la expresión de dos genes de defensa (*Pvltp-24* y *Pvlea-18*), la actividad de la catalasa, la formación de radicales libres y la lipoperoxidación en la raíz, tallo y hojas de esta planta. Los resultados de los bioensayos *in vitro* mostraron que el lixiviado acuoso de *S. deppei* inhibió 50% el crecimiento radicular del frijol, y el de *Z. guidonia* el 26%. El análisis de genes por DDRT-PCR en estos bioensayos, no mostró resultados positivos. Los resultados del experimento en el invernadero mostraron que el estrés aleloquímico causado por *S. deppei* afectó el crecimiento de las plántulas de frijol, inhibiendo 37 % el crecimiento de la raíz, disminuyendo 32 % el área foliar y 6 % la biomasa, pero no tuvo efecto sobre el crecimiento del tallo. Por otro lado, la descomposición de la parte aérea de *Z. guidonia* estimuló la raíz (32 %), el área foliar (35 %) y no tuvo efecto sobre el crecimiento del tallo ni sobre la biomasa del frijol. El análisis por Northern blot de la expresión de los genes de defensa *Pvltp-24* (transportadora de lípidos) y *Pvlea-18* (proteína LEA), mostraron que *Pvlea-18* se expresó en la raíz del frijol expuesto al estrés aleloquímico, pero no se observó su expresión ni en la hoja, ni en el tallo. La *Pvltp-24* se expresó en la hoja y en el tallo con ambos tratamientos. El estrés aleloquímico causado por la descomposición de *S. deppei* aumentó la actividad de la catalasa (20 %), en las hojas del frijol, observándose

también un aumento del 50 % en los niveles de radicales libres en la hoja, en el tallo de 180 % y en la raíz de 56 %, pero no tuvo efecto sobre la lipoperoxidación en ninguno de los tres tejidos. La descomposición de *Z. guidonia* aumentó la actividad de la catalasa en la hoja (17%) y en el tallo (14 %); los niveles de radicales libres aumentaron 42 % en la hoja, 90 % en el tallo y 56 % en la raíz, pero éste tratamiento no tuvo efecto sobre la lipoperoxidación.

INTRODUCCIÓN

1. ALELOPATÍA Y METABOLISMO SECUNDARIO

Las plantas están destinadas a crecer, desarrollarse y reproducirse en el lugar en el que germina la semilla que les dio origen. Desde el estadio de semilla y durante todo su ciclo de vida, la planta establece un gran número de interacciones bióticas, las cuales pueden ser perjudiciales, como el ataque constante de los patógenos, los parásitos y los herbívoros (hongos, bacterias, nemátodos, protozoos y virus) e incluso la convivencia y competencia con otras plantas; o bien benéficas, como la relación con mutualistas y simbioses. En el caso de las relaciones perjudiciales, la planta afectada presenta cambios en sus funciones fisiológicas normales, los cuales pueden resultar en una inhibición de su desarrollo, o incluso en su muerte. Frente a la diversidad de interacciones con los factores bióticos y abióticos del medio y ante la necesidad de sobrevivir y perpetuarse, las plantas han desarrollado una gran variedad de mecanismos de adaptación para hacerles frente a estos factores ambientales y comunicarse con otros organismos. Esta comunicación se logra a través de la producción de señales y mensajes químicos, los cuales se derivan, principalmente, del metabolismo secundario (Cano, *et al.* 1995). Una gran cantidad de estos compuestos o metabolitos secundarios (MS) se libera al ambiente por diversas vías: exudación, lixiviación y/o descomposición de la materia orgánica muerta. Los metabolitos secundarios juegan un papel importante en numerosas interacciones bióticas, por ejemplo, en la protección contra patógenos, en las asociaciones simbióticas (*Rhizobium* y micorrizas), en la germinación de semillas y en la interacción de las plantas con sus polinizadores. Otros MS, como algunos flavonoides, protegen a las plantas de la luz ultravioleta y de las radiaciones de onda corta (Mann, 1987)

Como se mencionó anteriormente, las plantas tienen interacciones con otras plantas de la misma o de diferente especie; en ocasiones, estas interacciones pueden ser perjudiciales. Los efectos nocivos que algunas plantas ejercen sobre otras se conocen desde hace mucho tiempo. Teofrasto (285 A.C.) y posteriormente Plinio II (1 D.C.) describieron algunos de estos efectos

perjudiciales, particularmente entre plantas cultivadas. Siglos después, De Candolle, en 1832, observó la llamada "enfermedad del suelo" en algunas parcelas agrícolas donde los cultivos mostraban un decremento en su productividad y desarrollo. De Candolle sugirió que este problema podía ser originado por compuestos tóxicos exudados al suelo por algunas plantas cultivadas, y que podría evitarse por medio de una adecuada rotación de cultivos (ver Rice, 1984).

1.1 DEFINICIÓN DE ALELOPATÍA

La Alelopatía es una ciencia que forma parte de la Ecología Química. El término alelopatía deriva de dos vocablos griegos: *allelon* = recíproco y *pathos* = sufrimiento y literalmente significa el efecto perjudicial de un organismo sobre otro (Rice, 1984). El fenómeno de la alelopatía es complejo y su definición ha ido cambiando con el tiempo. Inicialmente Molisch, en 1937, consideró el término alelopatía como el efecto perjudicial o benéfico, directo o indirecto, de una planta (incluyendo microorganismos) en la germinación, crecimiento y desarrollo de otras plantas a través de la producción de metabolitos secundarios que escapan al ambiente (citado en Devi, *et al.* 1997). La última definición de alelopatía se propuso en el 1er Congreso Mundial de Alelopatía, realizado en Cádiz, España (IAS, 1996). Esta definición intenta abarcar la vastedad y complejidad del fenómeno y la define de la siguiente forma: "*la alelopatía se refiere a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios (MS) producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, y, que influyan sobre otros sistemas biológicos*".

1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS (MS)

Los metabolitos secundarios son sintetizados a través de las mismas o similares vías de biosíntesis que dan origen a los metabolitos primarios (aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos carboxílicos) (Anaya y Cruz-Ortega, 2001). En algunos casos es sumamente difícil establecer una frontera definida entre metabolitos primarios y secundarios, y un ejemplo de ello, son muchos aminoácidos poco comunes que deben ser considerados MS, y por el

contrario, muchos de los compuestos considerados como secundarios se encuentran presentes en todas las plantas y son esenciales para la supervivencia de las mismas (Anaya, 2003).

1.3 CLASIFICACIÓN ECOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Las funciones mejor conocidas de los metabolitos secundarios son ecológicas, ya que se conoce muy bien su papel como mediadores en las relaciones entre los organismos. En éstas, los metabolitos secundarios son justamente los agentes químicos que acarrean información desde el organismo productor del ó los MS hacia el organismo receptor. Como se mencionó estos mensajeros químicos pueden tener un efecto positivo o negativo sobre el organismo receptor e incluso sobre el mismo productor y por su función informativa recibe el nombre genérico de infoquímicos (también conocido como semioquímicos). Si la interacción biótica en la que intervienen se establece entre organismos de la misma especie, los infoquímicos toman el nombre de feromonas; y si se trata de una relación entre organismos de diferente especie, se llaman aleloquímicos (Anaya, 2003).

1.4 CLASIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Los compuestos secundarios pertenecen a un amplio rango de compuestos químicos; sin embargo esta gran diversidad de productos naturales deriva de un grupo de materias primas sorprendentemente reducido, entre las que se encuentran el ácido acético y unos cuantos aminoácidos comunes (fenilalanina, tirosina y triptofano), por lo que se supone que los compuestos secundarios tienen un origen similar en toda la materia viva. Con algunas excepciones, los MS, pueden clasificarse sobre bases biosintéticas en cinco grupos principales: fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides (Anaya, 2003).

Existen tres precursores principales de estos cinco grupos:

1. El ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina), los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles.

2. Los aminoácidos que dan origen a los alcaloides, y a los antibióticos peptídicos incluyendo las penicilinas y las cefalosporinas.
3. El acetato, precursor de los poliacetilenos, las prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles e isoprenoides (terpenos, esteroides y carotenoides). Es importante señalar que las reacciones biológicas que están involucradas en la síntesis de los metabolitos primarios y secundarios están catalizadas por una diversidad de enzimas y en principio son reacciones reversibles (Anaya, *et al.* 2001).

1.5 MODO DE LIBERACIÓN DE LOS MS Ó ALELOQUÍMICOS

Debido a su naturaleza química, los MS o aleloquímicos pueden ser tóxicos para las plantas que los producen, por lo que éstas han tenido que desarrollar diversas estrategias para mantenerlos alejados de las zonas donde se efectúan reacciones de importancia metabólica, por ejemplo:

- Pueden inactivarlos y tornarlos inocuos combinándolos con distintos radicales o formando polímeros.
- Pueden ser almacenados en las vacuolas.
- Los depositan en células muertas (en el duramen de madera), en los espacios intercelulares, o bien, en los pelos glandulares de la superficie de las plantas.
- Los liberan al exterior.

Si los MS son retenidos dentro de la planta, pueden adquirir importancia como repelentes para los herbívoros o microorganismos patógenos, y si son liberados al exterior pueden inhibir a algunos competidores potenciales (Anaya, 2003). Un compuesto puede tener varios papeles en la naturaleza, por ejemplo puede ser un compuesto aleloquímico y depender del organismo productor y de los parámetros ambientales que influyen en el mismo organismo. El ácido tánico estimula el crecimiento de la langosta (*Anacridium melanorhodon*) (Bernays y Woodhead, 1982 en Inderjit y Duke, 2003), la estimulación se puede deber al efecto antimicrobiano del ácido tánico, el cual puede inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas presentes en el intestino del insecto (Dillon, *et al.* 2000 en y Inderjit -Duke, 2003).

El modo de liberación de los aleloquímicos de una planta donadora al ambiente juega un importante papel en el fenómeno de la alelopatía. Se han descrito cuatro rutas de liberación de estos compuestos al ambiente, basadas en su naturaleza química (Tukey, 1969) (Figura 1).

1. Descomposición de la materia orgánica o de la hojarasca
2. Exudación por la raíz
3. Lixiviación
4. Volatilización

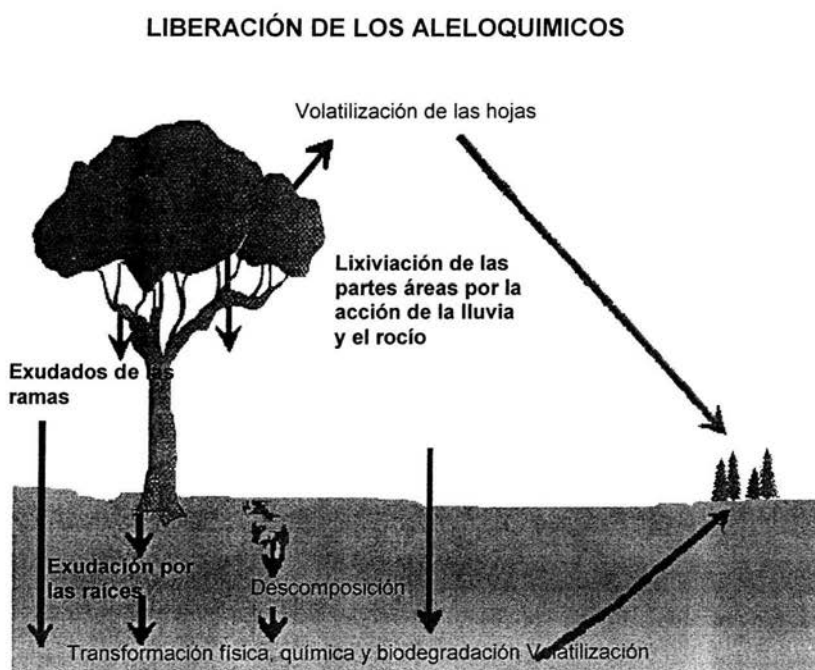


Figura 1. Formas de liberación de los aleloquímicos al medio (tomado de Reigosa, 1999).

1.5.1 DESCOMPOSICIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA O DE LA HOJARASCA

La descomposición de los residuos de las plantas proporciona una gran cantidad de compuestos aleloquímicos a la rizósfera (Devi, *et al.* 1997). Los factores que influyen en la descomposición son la naturaleza química de los residuos vegetales y el tipo de suelo y sus microorganismos. Es importante mencionar que la materia orgánica vegetal descompuesta probablemente no se distribuye de manera homogénea en todo el suelo, existen zonas que contienen mayor cantidad de compuestos provenientes de la descomposición. Esto origina que las raíces de las plantas receptoras, puedan ser afectadas en su crecimiento por los aleloquímicos acumulados durante la descomposición de la hojarasca proveniente de especies donadoras.

1.5.2 EXUDACIÓN DE LA RAÍZ

Factores como la edad de la planta, su estado nutricional y la humedad pueden influir en la calidad y cantidad de la exudación de las raíces (Devi, *et al.* 1997).

Los aleloquímicos pueden ser exudados o liberados de las raíces de varias plantas. En algunos casos, la reducción en la producción de los cultivos ha sido atribuida a la liberación de toxinas por las raíces de algunas arvenses que se encuentran cerca de estos cultivos. Varios de los compuestos liberados por las raíces de éstas arvenses no solo inhiben la germinación y el crecimiento de los cultivos sino el de otras arvenses, así como de algunos microorganismos, como por ejemplo, *Rhizobium*, lo que impide la formación de nódulos en las raíces de leguminosas y por ende la fijación de nitrógeno. Por ejemplo, los exudados de las raíces de *Medicago sativa* inhiben el crecimiento de la soya, el maíz y la cebada (Tszuzuki y Kawagoe, 1984, citado en Devi *et al.* 1997).

1.5.3 LIXIVIACIÓN

La lixiviación se refiere al lavado de sustancias de las plantas por la acción de la lluvia, nieve, niebla y rocío, por lo tanto proporciona una gran cantidad de aleloquímicos al medio. Existen grandes diferencias en la velocidad y el grado de lixiviación de las sustancias entre las diferentes especies, dependiendo del estado

fenológico de la planta donadora, la temperatura y humedad ambiental (Anaya, 2003).

Los aleloquímicos liberados a través de la lixiviación pertenecen a una gran variedad de sustancias inorgánicas y orgánicas, tales como los compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides (Rice, 1984). Muchos de estos compuestos han sido caracterizados por sus efectos tóxicos sobre plantas vecinas y microorganismos bajo condiciones de campo y laboratorio. Algunos lixiviados de semillas y hojas son tóxicos para varios cultivos. Por ejemplo, en un estudio en un ecosistema natural, Carballeira y Reigosa (1999) mostraron que los lixiviados acuosos de *Acacia dealbata*, obtenidos por los lavados de lluvia y colectados en las diferentes estaciones, tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *Lactuca sativa*.

1.5.4 VOLATILIZACIÓN

Los aleloquímicos que se volatilizan pueden ser absorbidos directamente de la atmósfera por las plantas vecinas o retenidos por las partículas del suelo, donde pueden permanecer por mucho tiempo, lo cual puede interferir con la germinación y desarrollo de otras plantas. La liberación de aleloquímicos por volatilización está frecuentemente asociada a las plantas que producen terpenos y monoterpenos. Por ejemplo, las especies de *Eucalyptus*, las cuales contienen gran variedad de estos compuestos, que pueden ser tóxicos para la germinación y crecimiento de varias plantas de cultivo (Del Moral y Muller, 1970, citados en Devi, *et al.* 1997). Diversas especies de la familia Cruciferae, han sido reportadas como plantas alelopáticas, por ejemplo, *Brassica oleraceae* y *B. campestris*, que producen glucosinolatos que no tienen efectos tóxicos, pero que cuando se hidrolizan, pueden formar isotiocinatos con propiedades fitotóxicas (Anaya, 2003).

2. MODOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS SOBRE LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS DE LAS PLANTAS.

Los aleloquímicos de la planta donadora pueden interferir directamente con los procesos metabólicos primarios de la planta receptora, induciendo en ésta un estrés particular: el estrés aleloquímico. La actividad biológica de estos compuestos va a depender de su naturaleza química, de su concentración, de la sensibilidad de la planta receptora, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales presentes (Putman y Tang, 1986).

2.1 EFECTO DE ALGUNOS ALELOQUÍMICOS SOBRE LA DIVISIÓN Y ELONGACIÓN CELULAR.

Varios estudios muestran que los aleloquímicos inhiben el crecimiento de las raíces, de los tallos y la expansión de las hojas de algunas plantas, al inhibir los procesos de mitosis y elongación que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los vegetales. Una disminución en la elongación de la pared celular en tejidos de coleóptilos de *Oryza sativa* causada por el ácido ferúlico, ha sido correlacionada con la inhibición del crecimiento de las plántulas (Devi, *et al.* 1997). Por otra parte, el lixiviado acuoso de *Mirabilis jalapa* inhibió 31% la mitosis en los meristemos de la raíz de plántulas de chícharo (Anaya y Pelayo-Benavides, 1997). Romagni y colaboradores (2000), reportaron que un componente de los aceites esenciales (1,8 cineol) inhibe todas las fases de la mitosis en raíces de *Cucumis sativus* y *Allium sativum*. La juglona, un compuesto fenólico, inhibe la elongación celular en raíces de *Pisum sativum* (Li, *et al.* 1993).

2.2 EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Muchos de los aleloquímicos modifican la síntesis y la actividad de varias enzimas de la planta receptora tanto *in vivo* como *in vitro*. Los aleloquímicos pueden regular la actividad de las enzimas de dos maneras: a bajas concentraciones tienden a aumentarla y a altas a inhibirla (Devi, *et al.* 1997). Por ejemplo, Jain y Srivastava, (1981, citado en Einhellig, 1986) reportaron que la actividad de la nitrato reductasa en *Zea mays* aumentó cuando fueron expuestas a 10 μM de ácido salicílico y fue

inhibida a una concentración de 1000 μM . El lixiviado acuoso de las hojas secas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) aumentó la actividad de la catalasa en las raíces de jitomate y frijol (Ayala-Cordero, 2001). En 1992, Devi y Prasad reportan la inhibición por el ácido ferúlico de la actividad de enzimas hidrolíticas como la amilasa, maltosa, invertasa, proteasas y fosfatasa ácida en semillas de maíz; estas enzimas están involucradas en el movimiento de la reservas de los nutrimentos.

2.3. EFECTOS SOBRE LA RESPIRACIÓN CELULAR

Los aleloquímicos inhiben o alteran la respiración dependiendo de su naturaleza química, de su concentración y de la edad de la planta receptora. Muchos compuestos fenólicos como las quinonas, flavonoides y fenoles interfieren con las funciones mitocondriales. Por ejemplo, el extracto etanólico del polen de maíz actuó como un inhibidor del transporte de electrones, disminuyendo el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hipocótilos de sandía (Cruz-Ortega, *et al.* 1988). El compuesto α -pineno, a concentraciones mayores a 1.0 mM, inhibe la respiración en mitocondrias aisladas de la raíz de *Zea mays*, y a una concentración menor la estimula (Abraham, *et al.* 2000).

2.4. EFECTOS SOBRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

En las células, las membranas son probablemente la línea de defensa contra los cambios ambientales adversos. Actúan como sensores del medio e inician cambios internos que conducen a las respuestas metabólicas. La dehidrozaluzanina C, una lactona sesquiterpénica, causa una alteración en la permeabilidad, en membranas aisladas de *Cucumis sativus*, ocasionando la salida rápida de iones (Galindo, *et al.* 1999). Los compuestos fenólicos, quinonas, terpenos y flavonoides disminuyen la fosforilación oxidativa ya que interfieren con la síntesis de ATP, y por lo tanto, alteran las funciones de la membrana y el metabolismo de la planta (Moreland y Novitzky, 1987). Cruz-Ortega y colaboradores (1990) reportaron que la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de *Ipomoea purpurea* fue inhibida un 67.2 % y la del tonoplasto un 31.6 %. Una

resina glucosídica aislada de *Ipomoea tricolor*, inhibe un 30 % la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de células de raíz de *Echinochloa crus-galli* (Calera, *et al.* 1995).

2.5 FOTOSÍNTESIS

La inhibición del crecimiento y, por lo tanto, la reducción del peso seco de una planta, debido al efecto de los compuestos aleloquímicos, puede estar relacionada con un efecto sobre la tasa fotosintética. Devi y Prasad (1996) reportaron una disminución de la asimilación del CO₂ y una reducción en la conductancia estomatal en semillas de maíz tratadas con ácido ferúlico. Patterson y col. (1981) (citado en Devi *et al.* 1997) reportaron que los ácidos p-cumárico, ferúlico, gálico, t-cinámico y la cafeína (un alcaloide), a una concentración de 1 mM, inhiben severamente la fotosíntesis en la soya (*Glycine max*), mientras que a una concentración de 0.1 μM no la afectan. Los aleloquímicos pueden alterar directamente la estructura de los cloroplastos, o bien, actuar sobre el cierre y/o apertura de los estomas, lo que también afecta la fotosíntesis. Einhellung y colaboradores (1986) mostraron que los extractos acuosos de hojas de *Kochia* y *Helianthus* causan el cierre de estomas en la soya. La sorgoleona inhibe el transporte de electrones entre la coenzima Q_A y Q_B en el fotosistema II, en cloroplastos aislados de *Triticum aestivum* y *Spinacia oleracea*, durante la fotosíntesis (González, *et al.* 1997).

2.6 EFECTO SOBRE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Los compuestos aleloquímicos también pueden tener un efecto sobre los ácidos nucleicos, aunque se han realizado pocos estudios acerca del tema. Baziramakenga y colaboradores (1997) reportaron que los ácidos benzoico, vainillico, cinámico y ferúlico inhiben la síntesis de RNA y DNA en *Glycine max*. También se ha reportado que la cafeína, inhibe la actividad de la DNA polimerasa I (Wink, *et al.* 1995).

3. EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS

Las plantas se ven sometidas a un gran número de condiciones ambientales que muchas veces no son las ideales para su desarrollo, aun así, existe una amplia distribución de la vida vegetal en toda clase de ambientes, la cual se da gracias a que las plantas cuentan con mecanismos muy eficientes para hacer frente a los factores ambientales adversos.

El estrés vegetal se define como cualquier cambio o factor ambiental, biótico o abiótico, que puede influir adversamente en el crecimiento o desarrollo de una planta. Los factores abióticos que causan algún tipo de estrés en las plantas son: escasez y/o abundancia de agua, radiaciones altas o bajas, temperaturas bajas como las heladas, la nieve y el granizo, sequía debido a una escasa precipitación y a altas temperaturas, deficiencia y/o toxicidad de minerales en el suelo. Los factores bióticos que causan estrés en las plantas son la sobrepoblación, la competencia, los patógenos, los herbívoros y las interacciones químicas (aleloquímicas) (ver sección de alelopatía, página 5) (Tabla 1). Este último es el tema del cual se ocupa el presente trabajo.

Tabla 1. Factores ambientales y relacionados con el hombre que pueden causar estrés vegetal (Reigosa y Pedrol, 2002).

Ambientales		Relacionados con el hombre
Abióticos	Bióticos	
Temperatura	Patógenos	Herbicidas, fungicidas, pesticidas,
Baja (Frío, granizo)	Virus,	Contaminación ambiental
Alta	Hongos	Fotooxidantes
	Bacterias	Lluvia ácida
Agua	Animales	Suelos ácidos
Déficit	Insectos y otros	Deficiencias minerales
Inundación ó	herbívoros	Contaminación por metales pesados
periodos largos de		Exceso de nitrógeno
lluvia, anoxia	Otras plantas	Incremento de luz ultravioleta
Radiación	Parasitismo	Cambio climático
Exceso o	Alelopatía	Aumento en la concentración de CO ₂
deficiencia	Competencia	Mayores extensiones de suelos salinos
Químicos		y/o secos
Iones		
Sal		
Deficiencia y/o		
exceso de		
minerales		

3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA AL ESTRÉS

Las plantas tienen un estado fisiológico óptimo para las condiciones particulares de sus ambientes naturales. La respuesta fisiológica de la planta a un factor de estrés depende de las características propias de la planta (genotipo), de su estado de desarrollo, de las condiciones ambientales prevalecientes, del tipo de estrés y de la duración e intensidad del mismo. En general, los mecanismos de defensa de las plantas al estrés pueden agruparse en dos categorías:

3.1.1 Mecanismos de Resistencia

Éstos previenen la exposición al estrés (Buchanan, *et al.* 2000), y se basan usualmente en componentes que permiten crear un ambiente interno en la planta, de tal manera que sus células no están bajo estrés aun cuando el ambiente externo sea muy adverso (Bidwell, *et al.* 1979). Un mecanismo de resistencia a la sequía es el que llevan a cabo las freatófitas, las cuales han optimizado la absorción de agua del subsuelo y pueden sobrevivir largos periodos sin lluvia (Buchanan, *et al.* 2000).

3.1.2 Mecanismos de Tolerancia

Éstos permiten a la planta soportar el estrés, lo que significa que una planta puede sobrevivir o funcionar normalmente bajo condiciones adversas, tanto internas como externas (Bidwell, *et al.* 1979). Por ejemplo, muchas plantas del desierto son xerófitas, toleran el déficit de agua porque sus características morfológicas les permiten sobrevivir en condiciones áridas (Buchanan, *et al.* 2000).

3.2. LOS GENES DEL ESTRÉS

Las plantas responden a las diferentes condiciones de estrés poniendo en marcha una secuencia compleja de acciones tales como:

- a) Percepción del estímulo estresante;
- b) Procesamiento de la señal de estrés percibida;
- c) Regulación de su expresión genética.

El estímulo externo debe transformarse en una señal interna, de naturaleza física o química. Después, esta señal se transmite, a través de cascadas o rutas de señalamiento, hasta el núcleo de las células, en donde se inicia la transcripción de nuevos genes, o bien, el aumento o disminución de la expresión de otros, para dar una respuesta de tolerancia al factor de estrés.

Entre los factores de estrés abiótico, la sequía y el déficit hídrico son los que más limitan el crecimiento de las plantas (Bray 1993). Por otro lado, la salinidad también es una limitante agrícola de gran importancia en algunas zonas áridas y tierras irrigadas, donde el uso del agua de mala calidad para el riego propicia la acumulación de sales en el suelo. Las plantas responden a estas condiciones a través de varios mecanismos: uno de ellos es la síntesis de proteínas, como por ejemplo, la osmotina, que es el producto de un gen inducido en respuesta a un estrés osmótico, y que tiene propiedades relacionadas con la tolerancia a la salinidad (ver revisión de Bray, 1997); la osmotina también es antifúngica ya que se acumula en respuesta a patógenos (Buchanan, *et al.* 2000).

Otros tipos de estrés ambiental capaces de inducir síntesis de proteínas de estrés son la luz ultravioleta (UV) y algunos metales pesados en el suelo. La luz UV induce enzimas de la biosíntesis de flavonoides, compuestos que actúan en la planta a manera de filtros impidiendo la penetración de dicha radiación hasta los cromosomas, donde provocarían un daño irreversible. Usando la técnica de despliegue diferencial se identificaron cinco genes (light stress-regulated) en respuesta al estrés por luz en las hojas de *Arabidopsis thaliana* (Dunaeva, *et al.* 2001). Por otro lado, los metales pesados, como el cobre y el cadmio en el suelo, inducen la síntesis de proteínas las cuales tienen capacidad de secuestrarlos, impidiendo así que los metales queden libres en el citoplasma de las células. La mayoría de las plantas no pueden sobrevivir en un ambiente de altas concentraciones de metales pesados, sin embargo, algunas especies no solo pueden crecer óptimamente en estos medios, sino que también acumulan metales pesados en raíces y hojas. Zhang y colaboradores (2001) identificaron el gen PvSR2, que se expresó en las hojas de *Phaseolus vulgaris* expuestas a

concentraciones altas de mercurio, y sugirieron que este gen podría tener un papel en la detoxificación de los metales pesados.

3.3. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las plantas expuestas a temperaturas altas presentan respuestas metabólicas y celulares, muchas de las cuales son similares en todos los organismos. Una de estas respuestas es la síntesis de proteínas llamadas de *Choque Térmico* (HSP, Heat Shock Proteins) la cual va acompañada de una disminución en la síntesis de otras proteínas preexistentes. Se ha observado que las HSP se expresan cuando la planta está expuesta a una temperatura, de al menos, 5 °C por encima de sus condiciones de crecimiento óptimo (Buchanan, *et al.* 2000).

Algunas HSPs son conservadas en todos los organismos vivos, tanto procariontes como eucariontes: muchas de estas proteínas funcionan como chaperoninas las cuales ayudan en el plegamiento de proteínas desnaturalizadas, por lo que confieren una cierta termotolerancia a la planta para sobrevivir un tiempo a temperaturas letales.

3.4 LEA, PROTEÍNAS ABUNDANTES DE LA EMBRIOGÉNESIS TARDÍA

Por otro lado, se han identificado proteínas en varias especies vegetales, del tipo de las LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales pueden contribuir a la tolerancia al frío, al estrés hídrico y al estrés salino. Las características generales de las proteínas LEA son:

Se localizan específicamente en el citoplasma de las células de las semillas que se encuentran en estado de desecación y/o maduración.

Son altamente hidrofílicas; la composición de aminoácidos de estas proteínas se caracteriza por la abundancia de residuos de alanina y glicina y por la ausencia de cisteína y triptofano (Buchanan, *et al.* 2000).

Durante los períodos de sequía o desecación las proteínas LEA pueden tener un papel de protección de la membrana (Taiz, 2002). Esta función protectora puede estar relacionada con su habilidad para retener o unirse a las moléculas de agua y así prevenir la cristalización de proteínas celulares importantes y otras

moléculas durante la desecación (Taiz, 2002). Otras funciones asignadas a éstas proteínas son: pueden ser secuestradoras de iones, tienen actividad de chaperoninas y transportadoras de proteínas (Colmenero-Flores, 1999).

Hasta ahora las proteínas LEA se han clasificado en cinco familias ó grupos, aunque recientemente se caracterizó la sexta (Colmenero-Flores, 1999). Esta clasificación está dada por el análisis de la secuencia de aminoácidos de las regiones de alta similitud entre proteínas de diferentes especies (Buchanan, *et al.* 2000). Los 6 grupos de proteínas LEA se muestran en la Tabla No. 2.

Tabla 2. Familias ó Grupos de proteínas LEA

	Proteínas Representativas	Características	Función Propuesta
Grupo 1 (familia D-19)	Em proteína de trigo	Tiene una alta capacidad para unirse con el agua. Su expresión está relacionada con la tolerancia durante un déficit hídrico	Se unen al agua para retenerla en las células, Se sobreexpresan en las levaduras con estrés hídrico.
Grupo 2 (familia D-11)	DHN1 (maíz) D-11 (algodón)	La mayoría de estas proteínas se localizan en el citoplasma y en el núcleo, y otras están asociadas con la membrana plasmática	Pueden estabilizar macromoléculas bajo condiciones de estrés hídrico.
Grupo 3 (familia D-7)	HVA1 (<i>Hordeum vulgare</i> inducida por ABA en el frijol) D-7 en el algodón	D-7 es muy abundante en semillas de algodón	HVA1, involucrada en la tolerancia al estrés en plantas transgénicas.
Grupo 4 (familia D-95)	D-95 de la soya	Un gene que codifica para una proteína similar en jitomate se expresa en respuesta al ataque por nemátodos	Se ha propuesto que su principal función es reemplazar al agua para preservar la estructura de la membrana.
Grupo 5 (familia D-113)	LE25 (jitomate) D-113 (algodón)	D-113 es muy abundante en semillas de algodón.	Pueden unirse a las membranas o a proteínas para mantener íntegra la estructura de la célula. Pueden secuestrar iones para proteger el metabolismo. LE25, confiere tolerancia a la sal y al frío en las levaduras.
Grupo 6 Nueva familia (Colmenero-Flores et al. 1999)	Pvlea-18 <i>P. vulgaris</i>	Experimentos de inmunolocalización indican que están presentes en el núcleo y en tipos celulares diferenciados.	Se acumula durante el estrés hídrico y en regiones de crecimiento en semillas de frijol La alta acumulación de PvLEA-18 en la radícula durante la germinación, sugiere que puede tener un papel de protección.

3.5 PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS, PTLs:

Otro tipo de proteínas constitutivas relacionadas con respuestas a factores de estrés son las de transferencia de lípidos (PTL), las cuales se encuentran en los animales, plantas, levaduras y en células procariontes. Las PTL se caracterizan por transferir fosfolípidos entre las membranas. Se ha observado que éstas proteínas aumentan su expresión en diferentes condiciones de estrés (Kader, 1996). Por ejemplo, Colmenero-Flores y colaboradores (1997) identificaron un gen de 617 pares de bases cuyo producto correspondió a una proteína de transferencia de lípidos en *Phaseolus vulgaris* sometidos a un estrés hídrico.

Las PTL tienen de 91 a 95 residuos de aminoácidos, se caracterizan por carecer de triptofano y tener ocho residuos de cisteínas localizadas en posiciones conservadas en su secuencia. Las PTLs constituyen una familia pequeña de proteínas con un peso aproximado de 9 kDa, aunque en el frijol y el trigo es de 7 kDa, tienen un punto isoeléctrico alcalino (9-10) y su estructura la forman α -hélices unidas con puentes disulfuro.

FUNCIÓN de las PTLs: pueden transferir lípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y glucolípidos. Estas proteínas también son capaces de unir ácidos grasos y Acetil CoA. Cuando las PTL son sintetizadas contienen un péptido señal, lo cual sugiere la posible secreción de estas proteínas, y apoya su posible papel en la construcción de la pared celular y más precisamente en la biosíntesis de la cutina (Buchanan, *et al.* 2000) (Figura 2).

No se ha explicado completamente el mecanismo de acción exacto de cómo transportan los fosfolípidos entre las membranas. Un mecanismo de transporte que va del sitio de síntesis del lípido al lugar de función, ha sido propuesto para la PTL de fosfatidilcolina en células de mamíferos. Este mecanismo sugiere que la fosfatidilcolina sintetizada en el retículo endoplásmico se une a la cavidad hidrofóbica de la PTL por medio del grupo acyl de una de sus cadenas, formando un complejo fosfatidilcolina-PTL, el cual se transporta a la membrana en donde libera la fosfatidilcolina, o bien, puede intercambiar la fosfatidilcolina por otro fosfolípido y transportarlo a otro sitio (Kader, 1996). Una secuencia de eventos similares ha sido propuesta para las PTL de las plantas, sin embargo, el complejo

fosfolípido- PTL no ha sido aislado en plantas. Un ejemplo de la función de las PTLs en plantas es el transporte de lípidos del retículo endoplásmico a la membrana de los tilacoides (Figura 2).

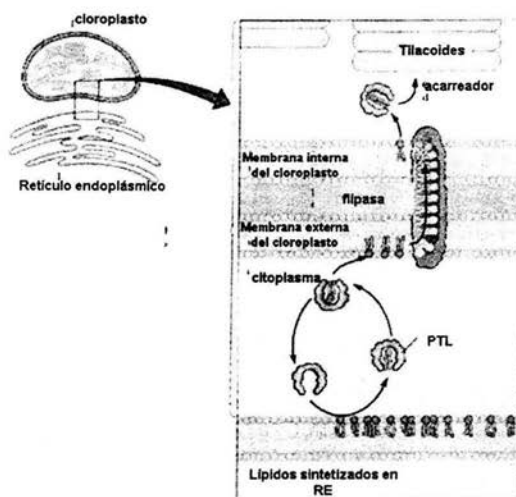


Figura 2. Esquema hipotético del movimiento de lípidos entre el retículo endoplásmico y el cloroplasto (Tomado de Buchanan, *et al.* 2000).

4. ESTRÉS OXIDATIVO

Otro tipo de estrés que puede dañar a las células de las plantas es el estrés oxidativo. Los factores que pueden causar este tipo de estrés son: la contaminación del aire (altas cantidades de ozono o dióxido de azufre), metales pesados, daño mecánico (herbívoros, aire), altas y bajas temperaturas, luz ultravioleta y condiciones intensas de luz que causan una fotoinhibición, y también se puede manifestar en respuesta a patógenos y durante la senescencia. El estrés oxidativo se produce por el aumento de las especies de oxígeno reactivo (ROS, Reactive Oxygen Species). La fotosíntesis y la respiración son los procesos que

producen mayores cantidades de ROS, aunque también se pueden generar en el retículo endoplásmico y la membrana plasmática. Las ROS pueden reaccionar con los lípidos de la membrana causando su peroxidación y por lo tanto provocándole un daño.

Las ROS reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas mas importantes: 1) por ejemplo en contacto con los ácidos grasos insaturados de los lípidos de las membranas forman peróxido de hidrógeno, 2) alteran la estructura de las proteínas, haciéndolas mas susceptibles al ataque de las proteasas, y, 3) causan mutaciones por delección en los ácidos nucleicos (Juszczuk, *et al.* 2001). Los ROS más comunes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (Buchanan, *et al.* 2000)

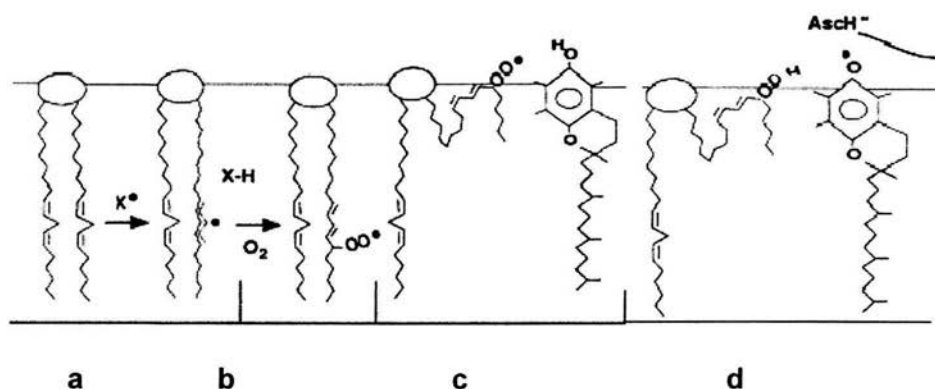
Fórmula química	Nombre
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno
$O_2^{\cdot -}$	Anión superóxido
$\cdot OH$	Hidroxilos
$O_2H\cdot$	Perihidroxilo
1O_2	Oxígeno en singulete

Por otra parte, algunas especies de oxígeno reactivas tales como $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 son requeridas para la lignificación de la pared celular y/o funcionan como señales en la respuesta a la infección por patógenos (Buchanan, *et al.* 2000).

5. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La peroxidación de lípidos se produce por la interacción de éstos con las especies reactivas de oxígeno. Los ácidos grasos o lípidos insaturados presentes en las membranas son muy susceptibles a la degradación peroxidativa causada por los radicales libres. El proceso de peroxidación de un ácido graso insaturado se inicia con la formación de dienos conjugados, generados por la eliminación de un átomo

de hidrógeno. Este radical reacciona con el oxígeno y forma un peroxiradical. El cual a su vez reacciona con otros ácidos grasos vecinos produciendo un hidroperóxido. Este último es muy inestable y se degrada para formar nuevos radicales libres como el alcoxil y peroxil, los cuales reaccionan fácilmente con otros lípidos. La reacción de peroxidación es propagada por la presencia de metales activos reductores, como son el Fe^{+2} y el Cu^{+2} (Yu y Matsui, 1994). Este proceso se ilustra en la figura 3.



- se genera un radical carboxilo en un ácido graso, éste reacciona con el O_2 para formar un radical peroxilo
- este radical puede migrar con lo cual hay un reacomodo de las dobles ligaduras
- en presencia de oxígeno se genera un radical peroxilo
- que se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido con lo que se propaga la reacción

Figura 3. Reacción de peroxidación de lípidos (tomada y modificada de Blokhina, 2000).

La peroxidación de lípidos causa invariablemente cambios o daños en la estructura molecular de la bicapa lipídica. Por otro lado, los productos de la lipoperoxidación tienen diversos efectos en las células tales como: desnaturalizan

el DNA e impiden la síntesis de proteínas; pueden provocar oxidación de aminoácidos, entrecruzamiento de proteínas, inhibición de diversos eventos metabólicos como la respiración o la actividad de enzimas (Priestley, 1986), aunque se ha visto que la peroxidación de lípidos puede ocurrir en condiciones normales. La peroxidación es uno de los procesos mas investigados, y durante la última década ha cambiado la idea de que es solo un proceso destructivo, se ha demostrado que la hidroperoxidación de los lípidos, los productos oxigenados de la degradación de los mismos, y los iniciadores de la peroxidación (i.e. ROS) pueden participar como segundos mensajeros involucrados en las rutas de transducción de señales en respuestas al estrés, como por ejemplo se ha visto que pueden activar vías de señalización de muerte celular programada (Mittler, 2002).

6. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES

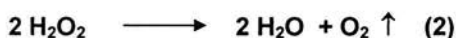
Bajo condiciones normales de crecimiento la cantidad de ROS que se produce en la célula se regula por medio de sistemas antioxidantes, los cuales los mantienen en un nivel que no produce ningún daño a la célula. Los sistemas de defensa antioxidantes son de dos tipos 1) no enzimáticos y 2) enzimáticos.

6.1 SISTEMA NO ENZIMÁTICO.

Los principales agentes antioxidantes de las plantas son: el ascorbato (Vitamina C), el cual juega un papel multifuncional, puede reaccionar rápidamente con el superóxido y con el singulete de oxígeno, con el ozono y el peróxido de hidrógeno, y también tiene un papel en el crecimiento y en la división celular (Malusa, *et al.* 2002); el glutatión reducido (GSH), el cual se localiza principalmente en el citoplasma, en mitocondrias y en los plastidos; el α tocoferol (vitamina E), los carotenoides, las poliaminas y los flavonoides que pueden proveer protección contra los radicales libres (Buchanan, *et al.* 2000).

6.2 SISTEMA ENZIMÁTICO.

Las enzimas antioxidantes son: la glutatión reductasa (GR), la ascorbato peroxidasa (APX); la dehidroascorbato reductasa (DHAR), la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. Un ejemplo de este sistema enzimático ocurre en los peroxisomas. Estos son organelos que contienen enzimas que utilizan oxígeno molecular para remover átomos de hidrógeno de substratos orgánicos específicos, en una reacción oxidativa que produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Alberts, 1994). La catalasa esta presente en los peroxisomas y tiene como función proteger a la célula de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno, rompiéndolo en oxígeno y agua. Esta enzima es una hemoproteína tetramérica que se aisló por primera vez del tejido hepático por Summer y Douce en 1937 (en Aebi, 1974). La mayoría de las catalasas purificadas contienen cuatro subunidades, cada una con un peso molecular de 60 kDa, un grupo hemo [Fe (III) protoporfirina] en el sitio activo y una molécula de NADPH (Halliwell y Gutteridge, 1989). Como ya se mencionó, la catalasa realiza la descomposición de peróxido (H_2O_2) e hidroperóxido funcionando, ya sea, como una peroxidasa en presencia de donadores de protones (1), o descomponiendo el H_2O_2 en H_2O y O_2 (actividad catalásica) (2).



ANTECEDENTES

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, han mostrado una gran diversidad de respuestas fisiológicas de algunas plantas cultivadas de prueba a los lixiviados acuosos de plantas con potencial aleloquímico. Por ejemplo, en bioensayos *in vitro*, se ha observado que el lixiviado acuoso al 1 % de *Sicyos deppei* tiene un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radicular del frijol y del jitomate (Romero-Romero, *et al* 2002, Romero-Romero, 2003), por el contrario, el lixiviado acuoso de *Zuelania guidonia* estimuló el crecimiento de las raíces de *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, *Cucurbita pepo* y *Amaranthus hypochondriacus* (Flores-Carmona, 2004).

Por otro lado, en un experimento realizado en el invernadero, se incorporaron hojas secas de *Z. guidonia* al suelo para observar el efecto de su descomposición sobre el crecimiento de malezas y del frijol. Los resultados mostraron que la hojarasca de *Z. guidonia* favoreció la aparición de malezas dicotiledóneas y redujo a las monocotiledóneas, así también, se observó una estimulación, aunque no significativa del crecimiento del frijol.

En un estudio fitoquímico biodirigido para identificar algunos de los compuestos bio-activos de *Z. guidonia*, se aislaron dos saponinas triterpénicas, con actividad sobre hongos fitopatógenos (Hernández-Maqueda, 2004).

Con respecto a los efectos del lixiviado de *S. deppei*, Cruz-Ortega, *et al.* (1998), reportan que las células de la periferia de las raíces de *P. vulgaris* y *Cucurbita ficifolia* presentaron plasmólisis y un mayor número de pequeñas vacuolas, efecto similar al de un estrés hídrico. Así mismo, la raíz del jitomate expuesta al estrés aleloquímico de *S. deppei* presenta cambios morfológicos importantes, como el grosor y el aumento de pelos radiculares (Romero-Romero, 2003).

En otro estudio sobre *Callicarpa acuminata* (*Verbenaceae*), especie con un alto potencial aleloquímico, se analizó el efecto del lixiviado acuoso sobre el patrón de proteínas en raíces de frijol, maíz y jitomate. Los resultados mostraron que la

expresión de varias proteínas, de diferente peso molecular, aumentaron, disminuyeron y/o desaparecieron, por efecto del lixiviado. En este mismo trabajo, la secuencia parcial de una proteína de 11.3 kDa, cuya expresión aumentó en las raíces de frijol, mostró un 94% de similitud a la subunidad alfa del inhibidor de la α -amilasa (Ayala-Cordero, 2001). También se observó que el lixiviado de *Callicarpa* aumentó la actividad de la enzima catalasa en las raíces de frijol, y por el contrario, no hubo un aumento en radicales libres ni en los niveles de lipoperoxidación.

Por último, en un estudio comparativo entre el efecto del estrés aleloquímico producido por el lixiviado de *S. deppei* y el estrés hídrico en raíces de jitomate, se demostró que los niveles de radicales libres aumentaron 40 % durante el estrés aleloquímico y disminuyeron 32 % durante el estrés hídrico. La peroxidación de lípidos y la actividad de la catalasa aumentaron en los dos tratamientos aunque fue mayor en el estrés hídrico (105%) (Romero-Romero, 2003).

HIPOTESIS

Si el estrés aleloquímico producido por una planta alelopática tiene varios blancos moleculares sobre la planta receptora y estudios previos han mostrado que las especies alelopáticas, *Sicyos deppei* y *Zuelania guidonia* causan diversos efectos sobre el crecimiento del frijol (planta receptora); estos efectos pueden estar determinados por los compuestos aleloquímicos de ambas especies, los que probablemente causan un daño oxidativo, que se manifestará por la producción de radicales libres, mecanismos antioxidantes y expresión de genes de defensa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés aleloquímico producido por los lixiviados acuosos y por la descomposición de la parte aérea seca de *Zuelania guidonia* y *Sicyos deppei* sobre el crecimiento, la expresión de genes y la generación de estrés oxidativo en las hojas, tallos y raíces de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae).

OBJETIVOS PARTICULARES.

Efecto de los lixiviados acuosos de Zuelania guidonia y Sicyos deppei:

1. Determinar el efecto de los lixiviados acuosos sobre el crecimiento de la raíz del frijol.
2. Determinar el efecto sobre el patrón de expresión de genes utilizando la técnica DD-RT-PCR en raíces del frijol.

Efecto de la descomposición de la parte aérea de Zuelania guidonia y Sicyos deppei :

3. Determinar el efecto del estrés aleloquímico producido por la descomposición de la parte aérea seca de *Zuelania guidonia* y *Sicyos deppei*, incorporada al suelo, sobre el crecimiento (área foliar, tallo, raíz y biomasa) del frijol.
4. Analizar la expresión por northern blot de dos genes de defensa: Pvlea-18 (LEA) y Pvltp-24 (transportadora de lípidos), en raíz, tallo y hojas.
5. Evaluar, tanto con geles nativos como por espectrofotometría, la actividad de la catalasa en raíz, tallo y hojas.
6. Determinar los niveles de radicales libres por quimioluminiscencia y el grado de lipoperoxidación por dienos conjugados en raíces, tallo y hojas.

DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA DEL MATERIAL VEGETAL

Las especies seleccionadas por su potencial aleloquímico fueron las siguientes:

Nombre	Familia	Nombre común
<i>Sicyos deppei</i> G. Don	Cucurbitaceae	Chayotillo, tatana
<i>Zuelania guidonia</i> (Sw.) Britt. & B Millsp	Flacourtiaceae	Tamay

Zuelania guidonia

SINONIMIA. *Zuelania roussoviae* Pittier.

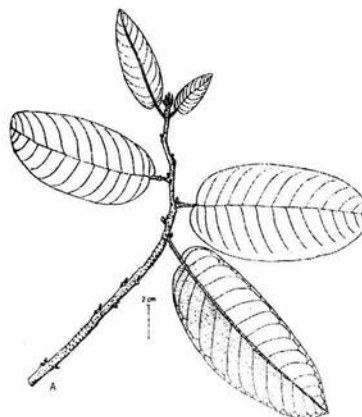
NOMBRES COMUNES. Trementina (Chis., Tab., Camp., Yuc., Q. Roo); volador (sureste de S.L.P. e Hgo., norte de Pue y Ver); manzano, manzanillo (norte de Oax., Ver.) anona de llano (Tab.); tamay (sur de la península de Yucatán); atmate, thácamate (huasteco, SL. PL); petlácotl (náhuatl); aiguané (zoque, Chis.); palo de piragüita (península de Yucatán); sacat'kihui (totonaco Ver.); tolonche (Yuc); volantín (S.L.P.); campanillo (Oax., Ver.); nopotapeste (centro de Ver.); nogalillo (norte de Pue.).

FORMA. Árbol monopólico de hasta 30 m y hasta 50 cm, con el tronco muy recto y un fuste largo y limpio, con la ramificación monopódica, las ramas horizontales y la copa redondeada o piramidal.

CORTEZA. Externa lisa, gris a pardo grisácea, con algunas lentécelas suberificadas y protuberantes. Interna de color crema amarillento a rosado, granulosa, con pequeñas gotas de exudado resinoso transparente y pegajoso. Grosor total de la corteza de 18 a 29 mm.

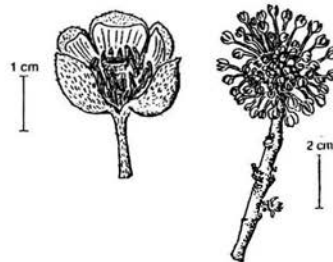
MADERA. Albura de color amarillento sin estructuras conspicuas.

RAMAS JÓVENES. Con cicatrices de hojas y estipulas caídas, pardo morenas, densamente pubescentes en las partes jóvenes, que se vuelven glabras con la edad, con lenticelas muy conspicuas, redondas y pálidas.

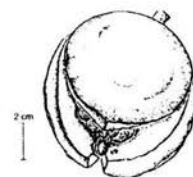


HOJAS: Yemas de 2 a 5 mm, agudas u obtusas rodeadas por numerosas estípulas pequeñas, densamente ferruginoso-pubescentes. Estípulas 2, de 2 mm de largo, lanceoladas, agudas, pubescentes, caedizas. Hojas alternas, simples; láminas de 7 x 2.5 a 20 x 7 cm, oblongas a estrechamente elípticas, con el margen entero, ápice agudo o acuminado, a veces redondeado, base redondeada, truncada o ligeramente cordada, a veces asimétrica; verde brillante con la nervadura pubescente en el haz, verde amarillento, opacas y pubescentes en el envés; numerosas glándulas transparentes en forma de puntos y rayas en la lámina; pecíolos de 8 a 18 mm, pubescentes; las hojas seniles adquieren un color rojizo antes de caer del árbol. Los árboles de esta especie pierden las hojas antes de florecer, de marzo a mayo.

FLORES. En densos fascículos terminales, de 4 a 5 cm de diámetro; pedicelos de 1 a 2 cm, pubescentes; flores con un fuerte olor a gardenia, actinomorfas, de 8 a 9 mm de diámetro; perianto de color crema verdoso, formado por 5 segmentos libres, de 6 a 7 mm de largo, oblongos u orbiculares, de ápice redondeado, imbricados, pubescentes en la superficie exterior; estambres numerosos, de 4 a 5 mm de largo, uniseriados; filamentos de color crema verdoso, que alternan con pequeños estaminodios oblongos; anteras de color crema amarillento o pardo; estambres glabros; ovario verde globoso, unilocular, multiovular, densamente pubescente; estilo muy corto, pubescente, terminado en un estigma aplanado de 2 a 2.5 mm de diámetro, color crema amarillento. Florece de marzo a junio.



FRUTOS. Cápsula de hasta 8 cm de diámetro, carnosa, trivalvaza, globosa, tardíamente dehiscente, con el cáliz y los estambres persistentes, de superficie rugosa, verde amarillenta, contiene numerosas semillas de 5 mm de largo, angulosas, rodeadas de una pulpa amarillenta.



ECOLOGIA Y DISTRIBUCION. Especie restringida a la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí, hasta la península de Yucatán, y del nivel del mar hasta los 500 o 700 m. Forma parte del

estrato superior o medio de selvas altas perennifolias o medianas subperennifolias y subcaducifolias, asociada principalmente con *Brosimum alicastrum*, *Apbanantbe monoica*, *Carpodiptera ameliae*, *Terminalia amazonia*, *Dialium guianense*, *Guatteria anomala*, entre otras. Se presenta exclusivamente en suelos de origen calizo con pocos afloramientos rocosos y con buen drenaje. Puede encontrarse como elemento abundante en la vegetación secundaria de selvas altas perennifolias y medianas subperennifolias.

USOS. Su madera se ha empleado para fabricar chapas para centros de madera terciada. En la actualidad no se usa a pesar de su abundancia debido a que otras especies tienen mejores características. Podría usarse para la fabricación de empaques ligeros de productos agrícolas. Su tronco es el más comúnmente usado como poste en el ritual de los “voladores de Papantla” (Pennington y Sarukhán, 1998).

***Sicyos deppei* G. Don (Cucurbitaceae) (chayotillo, tatana)**

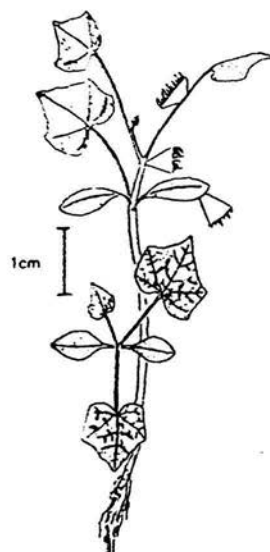
Hierba anual trepadora hasta de 3 o mas metros de largo, generalmente muy ramificada, forma cubiertas foliares densas. **Tallos** cilindricos, estriados, glabros o espaciadamente hirsutos cuando maduros, los jóvenes con pelos glandulares capitados; con zarcillos de 3 a 4 ramas. **Hojas** alternas, simples; peciolas de 1-9 cm de largo, hirsutos; lámina pentana a heptagonal o penta a heptalobada o partida de 2 a 20 cm de largo y lo mismo de ancho, ápice de los lóbulos casi siempre acuminado a caudado, aunque a veces agudo, borde serrulado a casi entero, base cordada con aurículas muy prominentes indumento escabroso, los pelos son diminutos, blanquecinos y con la base ensanchada o bien son multicelulares, nervadura actinódroma.

INFLORESCENCIA: flores masculinas en racimos axilares de 8 a 20 cm de largo sobre pedúnculos glandulosos de 10 cm o mas de largo; las femeninas con 5 a 15 flores en glomérulos axilares sobre pedúnculos de 1 a 2 cm de largo.

FLORES gamopétalas, pentapelobadas, radiadas, con sépalos lineares cortos; corola verdosa amarillenta, las masculinas sobre pedicelos de 4 a 6 mm de largo, con perianto de 0.5 a 1 cm de diámetro, con 3 estambres con filamentos fusionados y anteras formando una cabezuela; las femeninas sésiles con perianto de 2 a 3 mm de diámetro ovario ínfero, unilocular, uniovular, con 3 estigmas algo ensanchados.

FRUTOS. Seco, indehisciente, uniseminado, con números espinas caedizas.

Hierba común en la región; se le considera un problema debido a su habito trepador, florece de julio a noviembre (Cronquist, 1981).



Sicyos deppei

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las plantas con potencial aleloquímico utilizadas fueron: 1) *Sicyos deppei*, (Cucurbitaceae), la cual se colectó en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel en Ciudad Universitaria, D. F. y 2) *Zuelania guidonia* (Flacourtiaceae), colectada en la Reserva Ecológica "El Eden" en el estado de Quintana Roo. La parte aérea de ambas plantas fueron secadas a temperatura ambiente. La planta cultivada de prueba fue el frijol (*Phaseolus vulgaris*, var. flor de mayo, Fabaceae), que es una planta de gran importancia económica y alimenticia en nuestro país.

2. BIOENSAYOS *in vitro*

Se realizaron los bioensayos *in vitro* utilizando los lixiviados acuosos al 1 % de la parte aérea de *S. deppei* y *Z. guidonia*, los cuales se prepararon bajo condiciones estériles, utilizando una campana de flujo laminar. Los lixiviados se prepararon remojando 2 g de la parte aérea de cada una de las plantas en 100 mL de agua destilada estéril durante tres horas, y esterilizando los lixiviados por filtración con un filtro Millipore con membranas de 0.45 y 0.22 μm . La presión osmótica de los lixiviados se determinó con un osmómetro de punto de congelación (OSMETTE A). Esta medición se realizó para asegurar que la presión osmótica del lixiviado acuoso estuviera dentro del rango de tolerancia a este factor de las semillas de prueba (Anaya y Pelayo-Benavides, 1997).

Las semillas de prueba (frijol) se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos, y después se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada estéril para quitarles cualquier residuo de cloro. Posteriormente, en cajas de petri (9 cm), se mezclaron 10 mL del respectivo lixiviado acuoso (*S. deppei* o *Z. guidonia*) al 2 %, y 10 mL de agar (Merck) al 2 % para obtener una concentración final de la solución experimental de 1 %. Para el control se mezclaron 10 mL de agua estéril y 10 mL de agar al 2 %. Una vez solidificado el agar se colocaron 10 semillas de frijol en cada caja. Las cajas se sellaron con

parafilm y se colocaron en una estufa de germinación a 27 °C, en la oscuridad durante 48 h.

Diseño Experimental. Las cajas de petri se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Después de 48 horas se determinó el porcentaje de germinación y se midió la longitud de la raíz. Los datos sobre el crecimiento radicular fueron analizados por medio de un ANOVA (Zolman, 1993).

2.1 DESPLIEGUE DIFERENCIAL (DD-RT-PCR)

Con el objetivo de conocer la expresión diferencial de genes en las raíces de frijol tratadas con los lixiviados de *S. deppei* y de *Z. guidonia*, se realizó la técnica de despliegue diferencial, utilizando el RNAmapping kit (GenHunter Corporation) con dos sondas arbitrarias (AP1 y AP2).

2.1.1 Extracción y cuantificación de RNA

Las raíces del frijol obtenidas de los bioensayos *in vitro* se molieron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El RNA total fue aislado del tejido de los tratamientos y del control utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen). Brevemente: en un tubo eppendorf DEPC-estéril con 100 mg de tejido molido de cada muestra, se agregó 1 mL de Trizol y 10 µL de DEPC (MERCK) y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 3 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 8000 g por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio; se añadieron 200 µL de cloroformo y se agitó en un vortex por 15 seg. Se centrifugaron a 8000 g por 10 minutos a 4 °C y después, la fase acuosa que contiene el RNA total se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 0.5 mL de fenol:cloroformo:alcohol-isoamilico (GIBCO). Se agitaron en un vortex por 15 a 30 segundos y se centrifugaron a 8000 g durante 15 minutos. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, y a cada muestra se le añadió cloroformo en una relación 1:1 y se centrifugaron por 10 minutos. La fase acuosa se transfirió y después se precipitó con 120 µL de ácido acético 1M y 0.7 de

volumen total de etanol absoluto frío. Finalmente, las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 8000 g para obtener el botón de RNA, el cual fue lavado con etanol frío al 75 % (dos veces). Después de quitarles el exceso de etanol, cada botón se disolvió en 50 μL de agua DEPC y se cuantificó por espectrofotometría.

Cuantificación. La concentración y la pureza de las muestras de RNA son determinadas gracias a la cualidad que tienen los ácidos nucleicos para absorber luz ultravioleta a 260 nm. Las medidas de absorción en este margen permiten el cálculo directo de su concentración (Farell, 1998) utilizando 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} = es la absorbancia (en densidades ópticas) a 260nm

0.04 = es el coeficiente de extinción de RNA

FD = Factor de dilución: en nuestro caso, 500 μL de agua DEPC / 5 μL de muestra (100).

La pureza de las muestras de RNA se obtuvo mediante la tasa 260/280nm. Una muestra pura de RNA tiene una tasa A_{260}/A_{280} entre 2.0 y 1.7.

2.1.2 RT-PCR

El RNA total fue incubado con DNAsa (10 U/ μL , GIBCO-BRL) antes de llevar a cabo la técnica de la Transcriptasa Reversa, para asegurarse de no tener contaminación de DNA genómico. Después, el RNA se precipitó con 5 μL de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 200 μL de etanol absoluto frío, posteriormente se centrifugaron a 16000 g por 10 minutos y a 4 °C. Después el botón de RNA se resuspendió con 20 μL de agua DEPC y se cuantificó por espectrofotometría. La integridad del RNA antes y después del tratamiento con DNAsa se verificó con un gel de agarosa (Gibco-BRL) al 1.0 % (Sambrook, 1989).

La técnica de transcriptasa reversa se utilizó para obtener una cadena complementaria de DNA (DNAc) a partir de RNAm. Después del tratamiento con DNAsa se utilizaron 0.3 µg de RNA total del control y de los tratamientos para obtener la cadena complementaria. La reacción de 20 µL totales contenía: 50 U/µL de enzima RT MuMoLV (Moloney murine, leukaemia virus reverse transcriptase, Gibco/BRL), 10 µM oligo (dT)-primers, 20 µM de la mezcla de dNTP (A; C; G; T); amortiguador 5X RT, agua-DEPC, RNA total (0.3 µg). Antes de añadir la enzima se desnaturizó el RNA a 65 °C por 5 minutos, y después de 10 minutos a 37 °C se agregó la enzima y se dejó continuar la reacción durante 50 minutos, posteriormente la reacción se paró a 75 °C y el DNAc obtenido se guardó a 4 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar los fragmentos de DNAc se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Cada reacción de 20 µL totales contenía, 4 µL DNAc, 2 µL de sonda arbitraria (MTP1 / MTP2, 2.0 µM), 2 µL de 10X de amortiguador de PCR (sin MgCl₂), 1.6 µL de 2 µM de 4dNTP, 1.5 µL de [S³⁵]-dATP 10 UCi, /µL, 0.2 µL de 5U/ µL de enzima *Taq polimerasa* (Perkin-Elmer) y 8.7 µL de agua. El programa de PCR fue el siguiente: 30 segundos de desnaturización a 94 °C, 2 minutos de alineamiento a 40 °C y 30 segundos de elongación a 72 °C, lo que se repitió por 39 ciclos, y un periodo final de 5 minutos de elongación a 72 °C. Estas secuencias de DNAc de cada población de RNA mensajero, fueron analizadas en un gel de acrilamida/urea.

Gel de acrilamida-urea al 6%. Para analizar el DNA amplificado se preparo un gel de acrilamida-urea al 6 % como se describe en Sambrook, *et al.* (1989). Brevemente: 42 g de urea se disolvieron en 30 mL de agua, se añadieron 15 mL de acrilamida (solución madre de 40%) y 5 mL de amortiguador TBE; esta solución se aforó a 100 mL y posteriormente se filtró por Millipore y se desgasificó por 15 minutos, y por último se añadieron 300 µL de persulfato de amonio (BIO-RAD) y 50 µL de TEMED (BIO-RAD). Inmediatamente se cargó el gel y se dejó polimerizar por aproximadamente 12 horas. El gel se corrió previamente a 60 watts (2000 volts) con TBE 1X durante 1 hora para que alcanzara una temperatura

de 45 °C. Las muestras se prepararon con 3 μ L de amortiguador de carga y 5 μ L de DNAc amplificado, se calentaron a 60 °C por 2 minutos, y se cargaron en el gel, el cual se dejó correr por 3 horas a 60 watts (1700 Volts). Después de este tiempo, el gel se transfirió a un papel Whatman 3MM y se secó en un secador de geles (BIORAD modelo 583) a 80 °C por 1 hora. Posteriormente el gel se expuso a una película de radiografía por 48 h a -70 °C.

Análisis del gel. Las densidades de las diferentes bandas permitieron la identificación de los genes que fueron alterados de alguna manera por los tratamientos. Las bandas más oscuras o con mayores densidades representaban genes que eran sobre-expresados o inducidos. Las bandas mas claras o menos densas representaban genes cuya expresión fue disminuida (Figura 4).

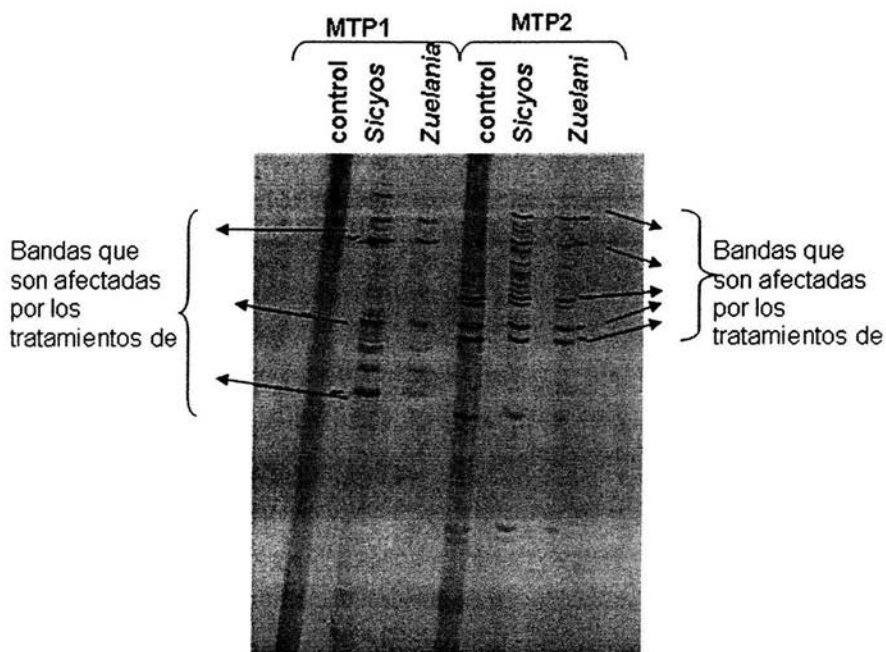


Figura 4. Despliegue diferencial de los genes expresados en las raíces del frijol tratadas con los lixiviados de *S. deppei* y *Z. guidonia*. Para este despliegue se utilizó el oligo dT (MT) y las sondas arbitrarias MTP1 y MTP2. Las bandas enmarcadas se clonaron y se secuenciaron.

Las bandas que consideramos que se habían sobre-expresado o disminuido, se cortaron del gel. El DNA se extrajo de la siguiente manera: las bandas se colocaron en 100 μL de agua, se calentaron a 90 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, y se centrifugaron a 16000 g durante 15 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio al que se le añadieron 5 μL de glucógeno (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 μL de acetato de sodio (5 M) y 450 μL de alcohol absoluto, y se dejó precipitar a -70 $^{\circ}\text{C}$. Cuatro μL de DNA se reamplificaron por PCR, en las condiciones descritas anteriormente. El producto del PCR se observó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (1 %) y se cortó y purificó con el kit Wizard DNA clean up System (Promega). Posteriormente se realizó la clonación de los fragmentos con el Kit TA-Cloning que utiliza el vector pCR 2.1 (Original TA cloning Kit, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, la reacción de ligación (vector más producto de PCR) contenía (1 μL del vector pCR 2.1); 1 μL de 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl_2 y 4 μL del producto de PCR), esta reacción se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la transformación de las células competentes.

Transformación. A 100 μL de células competentes (*E. coli* cepa DH5 α) se les añadió 1 μL de la reacción de ligación, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y después se les dio un choque térmico a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto. Se agregaron 900 μL de medio LB (Luria-Bertani, pH 7.0) a temperatura ambiente, y después el tubo se colocó en un agitador (Environ, Lab-Line) para que las bacterias crecieran a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm por 1 hora; al término de este tiempo los tubos se colocaron en hielo y las bacterias se sembraron en cajas de petri con medio LB que contenía 100 μg de ampicilina y XGal (40 mg/mL) dejando crecer las bacterias toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$. El XGal permite seleccionar las bacterias transformadas (blancas) de las no transformadas (azules).

Purificación del plásmido (vector pCR 2.1). Una colonia blanca de bacterias (transformada) se cultivo en 5 mL de medio LB y se dejó crecer toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$ y agitación de 250 rpm. Posteriormente el medio se centrifugó a 700 g y la

purificación del plásmido se realizó utilizando el Kit QIAprep (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del proveedor. La concentración del plásmido se determinó a 260/280 nm.

Secuencia del inserto. Los fragmentos clonados se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Una vez obtenidas las secuencias, éstas se compararon con la base de genes (NCBI, National Center for Biotechnology Information). El resultado de ésta comparación de las bandas encontradas o que responden al tratamiento reveló que no existía ninguna similitud con otras secuencias de genes de plantas.

3. EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO

Para evaluar el efecto del estrés aleloquímico causado por las plantas alelopáticas *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre el crecimiento del frijol, el daño oxidativo generado y la expresión de proteínas relacionadas con el estrés hídrico, se realizó un experimento en el invernadero como se describe a continuación:

Tratamientos. Se utilizaron macetas de 0.5 L que se llenaron con 400 g de una mezcla de tierra de hoja (previamente tamizada) y agrolita, en una proporción 2:1 respectivamente. Los tratamientos se prepararon con 1.5 % (g/g) de hojas (trituradas) de cada planta alelopática, *Z. guidonia* y *S. deppei*, de la siguiente manera: a 400 g de tierra se le añadieron 6 g de hojas trituradas. Se utilizaron dos controles: uno al que solamente se le agregaron 400 g de la mezcla de tierra y agrolita (control 1), y otro al que se le agregaron 400 g de la mezcla de tierra y agrolita y 6 g de vermiculita, la cual se utilizó para simular el efecto físico de las hojas secas trituradas (control 2). En cada maceta se transplantaron 6 plántulas de frijol de 48 h de edad. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento y las macetas se colocaron bajo un diseño completamente al azar dentro de una caja cubierta con malla blanca (tul), para evitar la invasión de insectos que pudiesen dañar a las plantas de frijol.

Las macetas se regaron por primera vez a capacidad de campo y después fueron regadas con 100 mL de agua cada tercer día. Después de 4 días de iniciado el experimento se quitaron 2 plantas de frijol (la de mayor y la de menor tamaño) con el fin de tener solo 4 plantas con un tamaño semejante. El experimento tuvo una duración de 10 días. Después de éste tiempo, se eligieron al azar cuatro macetas de cada tratamiento, para determinar los siguientes parámetros a las plantas: peso fresco y seco (biomasa), longitud de la raíz y tallo, y área foliar, ésta última se midió con un medidor de área foliar (LiCor 6200). Las plantas de las otras dos macetas de cada tratamiento se separaron en hojas, raíz y tallo y se congelaron y molieron en nitrógeno líquido. Los tejidos se guardaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (REVCO) hasta ser utilizados en las pruebas bioquímicas. Este experimento se realizó por duplicado.

4. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS, Pvltp-24 Y DE EMBRIOGENESIS TARDÍA Pvlea-18

4.1 OBTENCION DE LAS CLONAS.

Las clonas de *Phaseolus vulgaris* de la proteína transportadora de lípidos Pvltp-24 (LTP) y la de embriogénesis tardía Pvlea-18 (LEA) fueron donadas por la Dra. Alejandra Covarrubias del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Transformación. La técnica de transformación y de purificación del plásmido se realizaron como se describió anteriormente, con la única excepción de que se utilizó 1 μL de la clona Pvltp-24 (LTP) y de Pvlea-18 (LEA).

Reacción de digestión. Para confirmar los tamaños de las clonas se realizó la reacción de digestión. Para un volumen de 10 μL se añadieron las siguientes soluciones: 2 μL de clona purificada, 1 μL de amortiguador de digestión, 1.5 μL de enzima ECORI (10 U/ μL , Invitrogen), 1 μL de enzima HINDIII (10 U/ μL , Invitrogen) y 4.5 μL de agua estéril. La reacción se llevó a cabo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. El inserto se observó en un gel de agarosa al 1 % (Figura 5).

Purificación del plásmido en el gel de agarosa. En el gel de agarosa se localizaron las bandas correspondientes a las clonas Pvltp-24 (LTP) de **617 pb** y la de embriogénesis tardía Pvlea-18 (LEA) de **504 pb** (Figura 5).

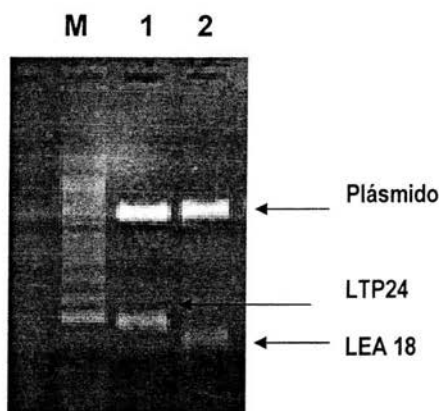


Figura 5. Gel de agarosa al 1 % de las clonas Pvltp-24 (1) y Pvlea-18 (2), marcador de DNA (M)

Después de la electroforesis en gel de agarosa al 1 % se verificó que el tamaño (número de bases de pares) correspondiera al reportado para cada una de las clonas. Posteriormente, la banda se purificó utilizando el kit de Millipore Ultrafree (Millipore) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se obtuvieron aproximadamente 100 μL por cada banda purificada, los cuales se concentraron a un volumen aproximado de 16 μL en un Speed Back (RCT1010 Jouan).

Marcaje no radioactivo de DNA. El marcaje y detección de DNA se llevó a cabo siguiendo la metodología del Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit II (ROCHE). Los 16 μL de cada clona se desnaturalizaron en agua hirviendo por 10 minutos y rápidamente se pusieron en hielo, después se agregaron 4 μL de DIG-HIGH prime y la reacción se dejó incubando toda la noche a 37 °C

Análisis por Northern blot. Esta técnica fue realizada como se describe en Sambrook, *et al.* (1989). Se utilizaron 20 µg de RNA total, aislado de la raíz, tallo y hoja de frijol, tanto del control como de los tratamientos. El RNA se separó en un gel de agarosa-formaldehído (1.7%) para posteriormente ser transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim).

Pre-hibridización e hibridización. La membrana se pre-hibridizó en 10 mL de amortiguador de pre-hibridación (Dig Easy Hyb granules) a 42 °C durante 2 horas. Se utilizaron 25 ng/mL del DNAC marcado con el DIG High prime de cada una de las clonas, Pvlea-18 y Pvltp-24, los cuales se añadieron a 5 mL del amortiguador de hibridación (DIG Easy Hyb). La sonda marcada se desnaturalizó por ebullición durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. La membrana se sumergió dentro de esta solución y se dejó hibridar durante 20 h a 42 °C (tiempo recomendado por el proveedor).

Lavados con SSC. Después del tiempo de hibridación, la membrana se lavó en 30 mL de SSC 2X con 0.1 % de SDS por 15 minutos a temperatura ambiente (dos veces). Después se lavó en 30 mL de SSC 0.5X con 0.1 % de SDS por 15 minutos a 55 °C.

Detección. La membrana se colocó en 20 mL de amortiguador de lavado (ácido maleico 0.1 M (Sigma) y Tween 20 al 0.03 % (Sigma)) por 1 minuto. Después se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en 10 mL de solución bloqueadora (1 mL de solución bloqueadora 10X diluida en 9 mL de 0.1 M ácido maleico). Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo (Anti-Digoxigenina-conjugados con fosfatasa alcalina) en una dilución 1:10000, en solución bloqueadora fresca durante 30 minutos a 37 °C. La membrana se enjuagó dos veces con amortiguador de lavado durante 15 minutos 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 minutos a temperatura ambiente. Por último, la membrana se colocó, con la cara del RNA hacia arriba, en un acetato y se le aplicaron 0.2 mL de CSPD (sustrato quimioluminiscente de fosfatasa alcalina), se cubrió con otro

acetato y se incubó por 30 minutos a 37 °C. La membrana se expuso a una placa radiográfica por 1 hora.

5. ACTIVIDAD DE LA CATALASA, RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACIÓN

5.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Se realizó una extracción de proteínas totales de la raíz, el tallo y las hojas del frijol del experimento de invernadero, con los tratamientos: de *Z. guidonia* y *S. deppei*, y los controles. Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Para cada extracción se utilizaron 100 mg de tejido, a los cuales se les añadió 1 mL de amortiguador de extracción K-PO₄ 50 mM, pH 7.2 y DTT 5 mM (Bio-Rad). El tejido se molió con un homogeneizador Tissue Tearor (Biospec Products, INC), manteniendo el tejido en hielo. Posteriormente se centrifugó a 3000 g por 10 minutos a 4 °C para remover los restos celulares. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976).

Preparación y tinción del gel nativo. El gel se preparó según el método de Laemmli (1970). Se cargaron 25 µg de proteína de cada tratamiento, y las proteínas se separaron en un gel al 6 % de acrilamida, la electroforesis se llevó a cabo a 20 Volts durante 16 horas. 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 fijaron en una solución de metanol al 5 % por 5 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada, posteriormente los geles se incubaron en una solución al 0.1 % de peróxido de hidrógeno como sustrato por 20 minutos. Después de este tiempo los geles se enjuagaron con agua destilada y las bandas de actividad se revelaron con una solución al 2 % de ferricianuro de potasio (Baker) y 2 % de cloruro férrico (Baker).

Durante esta reacción, en las regiones del gel donde existe peróxido de hidrógeno y con 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 existe peróxido de hidrógeno, este precipitado no se forma, observándose zonas claras en el gel. En el momento de observar las bandas de actividad se detuvo la reacción agregando una solución al 10 % de ácido acético con 30 % de metanol.

Preparación de la muestra para determinar la actividad de la catalasa por espectrofotometría. Las proteínas se extrajeron con un amortiguador que contenía K-PO₄ 100 mM y EDTA 0.1 mM, pH 7.8. Las muestras se centrifugaron a 3,000 g por 10 minutos a 4 °C para remover restos celulares. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4 °C y después se pasó a través de una columna de Sephadex G25 (Sigma) para remover compuestos de bajo peso molecular que interfieren con la medición de la actividad de la enzima; el filtrado se colectó centrifugando a 1500 g por 5 minutos. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976).

Medición de la actividad por espectrofotometría. La actividad de la catalasa se midió a 240 nm en un espectrofotómetro, con peróxido de hidrógeno como sustrato y 50 µg de proteína total en un volumen de 1 mL de acuerdo con la metodología descrita en Beers y Sizer (1952). Los componentes de cada reacción y los volúmenes correspondientes se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Componentes y volúmenes de la reacción para medir actividad de catalasa por espectrofotometría.

Componentes de la reacción	Volumen para cada tubo de reacción		
	Blanco	Control H ₂ O ₂	Muestra
50 mM KPO ₄ pH7.0	700 µL	700 µL	750 µL
H ₂ O destilada	300 µL	100 µL	-----
H ₂ O ₂ (50mM)	-----	200 µL	200 µL* (10mM)
Extracto proteico	-----	-----	50 µg de proteína**

*La reacción se inicia al adicionar éste reactivo

**Volumen necesario para 50 µg de proteína ajustando el volumen del amortiguador de fosfatos para que el volumen total fuera de 1mL

La actividad de la catalasa se determinó por la disminución en la concentración de peróxido de hidrógeno, reflejada por la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 180 segundos, tomando una lectura cada 20 segundos. La determinación de la actividad de la catalasa se realizó con tres repeticiones y en dos experimentos por separado. La cantidad de sustrato consumido (mmoles de H₂O₂), por la cantidad de proteína contenida (mg), por el tiempo, se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

m = pendiente

ε = Coeficiente de extinción molar (40 mM⁻¹ cm⁻¹)

1000 = factor de conversión por volumen para pasar de Mol a mmol.

60 = factor de conversión de tiempo en minutos

prot (mg) = proteína en miligramos

5.2. MEDICIÓN DE RADICALES LIBRES

Método por quimioluminiscencia. Para determinar si el estrés aleloquímico causado por *S. deppei* y *Z. guidonia* generaba radicales libres (ROS) en la planta de frijol, éstos se determinaron por medio de la técnica de quimioluminiscencia con el reactivo luminol, utilizando un contador de centelleo. El luminol es oxidado por los ROS: superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hidroxilo (OH) y el oxígeno en singulete (¹O₂), a un anión aninofalato electrónicamente excitado, el cual emite fotones, lo que hace posible medirlos en el contador de centelleo (Cadenas y Helmut, 1984).

La mezcla de la reacción contiene un amortiguador de acetato de amonio (0.5 M, pH 10.5) cloruro de cobalto (250 μM) y luminol (50 μM) con carbonato de sodio (1 mM). A cada vial se le añadió un volumen de 4 mL de esta mezcla y se dejaron incubar durante 10 minutos en la oscuridad. Después de este tiempo las

muestras se leyeron en el contador de centelleo con el programa para quimioluminiscencia, estas lecturas se tomaron como los registros o lecturas iniciales. Posteriormente, a cada vial se le añadieron 0.060 mg de proteína del control o de cada tratamiento; se volvieron a leer y se tomó el conteo mayor como lectura final. La cantidad de radicales libres producidos se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de Radicales libres} = \frac{\text{cpm lectura final} - \text{cpm lectura inicial}}{0.060\text{mg}}$$

La cantidad reportada de radicales libres fue el promedio de tres repeticiones y de dos experimentos independientes.

5.3 PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA.

Para determinar si el estrés aleloquímico causado por *S. deppei* y *Z. guidonia* causan una lipoperoxidación en la membrana se realizó la técnica de detección de dienos conjugados descrita por Recknangel y Glende (1984). Las muestras de proteínas, tanto de raíces, tallos y hojas de los controles como de los tratamientos se obtuvieron de la forma descrita anteriormente. Un mg de proteína se disolvió en 1 mL de agua bidestilada y 4 mL de solución de Folch (cloroformo y metanol 2:1).

Esta mezcla se agitó durante unos segundos y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 7000 g por 5 minutos para separar las fases: cloroformo, proteína y metanol. La fase inferior de cloroformo se extrajo con la ayuda de una pipeta pasteur y se transfirió a un tubo limpio. El tubo se colocó en un baño María hasta evaporar por completo el cloroformo, después se añadieron 1.6 mL de ciclohexano puro, se agitaron las muestras perfectamente y se midió su absorbancia a 233 nm, utilizando ciclohexano puro como blanco.

RESULTADOS

1. BIOENSAYOS *in vitro*

Los resultados de los bioensayos para evaluar el efecto de los lixiviados acuosos de las hojas secas de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre el crecimiento de la raíz del frijol, mostraron que el lixiviado de *S. deppei* lo inhibió 50 % y el de *Z. guidonia* 26 %, en comparación con el control (100 % de crecimiento) (Figura 6).

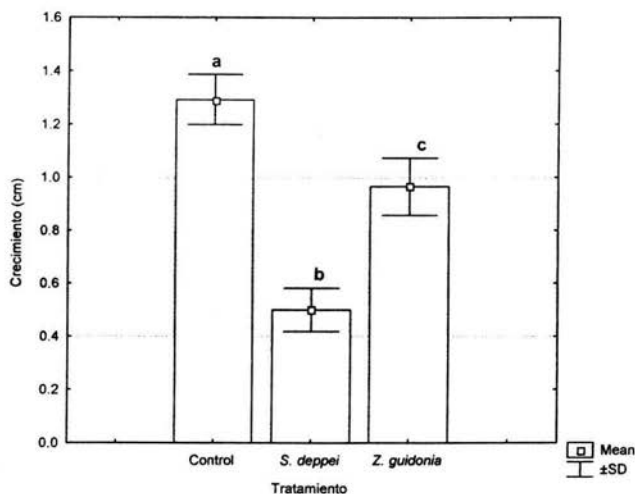


Figura 6. Efecto del estrés aleloquímico causado por los lixiviados acuosos de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre el crecimiento de la raíz del frijol. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

2. EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO

Los resultados obtenidos en los experimentos en el invernadero para evaluar el efecto del estrés aleloquímico, causado por la descomposición de la parte aérea seca de *S. deppei* y *Z. guidonia*, sobre el área foliar, la biomasa y el crecimiento de la raíz y del tallo del frijol se muestran a continuación.

2.1. EFECTO SOBRE EL ÁREA FOLIAR DEL FRIJOL

El área foliar de las plantas de frijol aumentó (35 %) con *Z. guidonia* y disminuyó significativamente (32 %) con el tratamiento de *S. deppei*, con respecto a los controles 1 y 2 (sin y con vermiculita respectivamente), entre los cuales no hubo diferencia significativa (Figura 7).

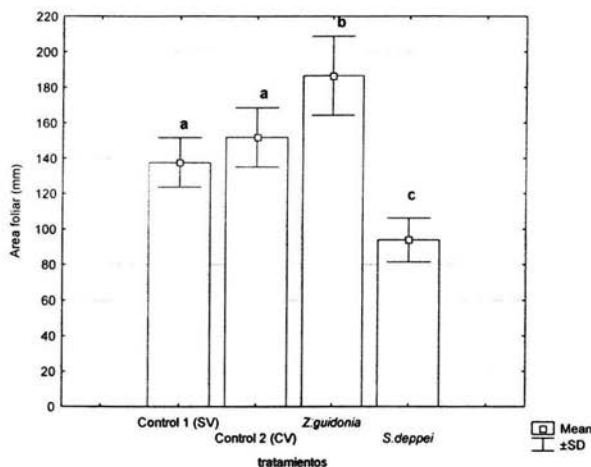


Figura 7. Efecto del estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *Z. guidonia* y *S. deppei* en el suelo, sobre el área foliar del frijol, después de 10 días de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

2.2 EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TALLO Y DE LA RAIZ DEL FRIJOL.

El estrés aleloquímico causado por la descomposición de *Z. guidonia* y *S. deppei*, no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento del tallo del frijol. Sin embargo, sí tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de la raíz, el cual fue estimulado (35 %) por *Z. guidonia* e inhibido (37 %) por *S. deppei* con relación a los controles (1 y 2), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos (Figura 8).

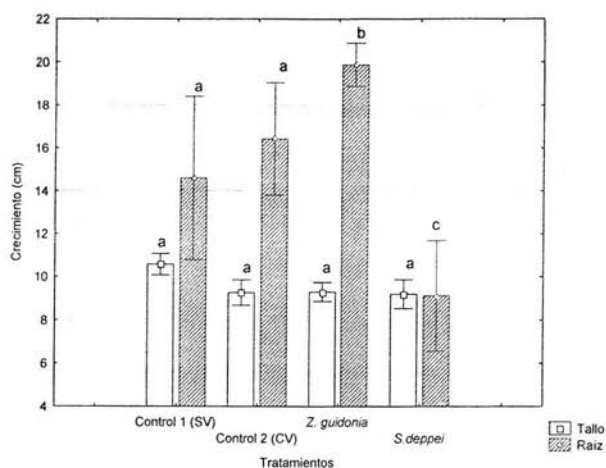


Figura. 8. Efecto del estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *Z. guidonia* y *S. deppei* en el suelo, sobre el crecimiento del tallo y la raíz del frijol, después de 10 días de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

EFFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL FRIJOL. El tamaño de las plántulas de frijol expuestas al estrés aleloquímico causado por *S. deppei* fue 28% menor, en cambio con *Z. guidonia*, el tamaño de la planta fue mayor (16%) comparado con los controles 1 y 2 (Figura 9).

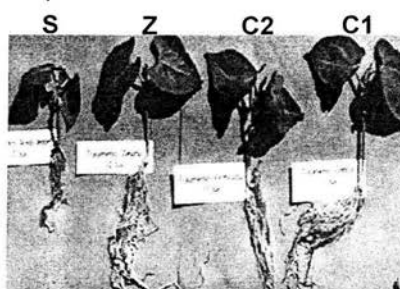


Figura. 9. Efecto sobre el crecimiento del frijol expuesto al estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *S. deppei* y de *Z. guidonia*, después de 10 días de crecimiento. Control 1 (C1), Control 2 (C2), *Z. guidonia* (Z) y *S. deppei* (S).

2.3 EFECTO SOBRE LA BIOMASA DEL FRIJOL

La biomasa del frijol (g de peso seco) se vio afectada únicamente con el tratamiento de *S. deppei*, en el cual disminuyó un 6% con respecto a los controles (1 y 2) ($p < 0.05$) (Figura 10).

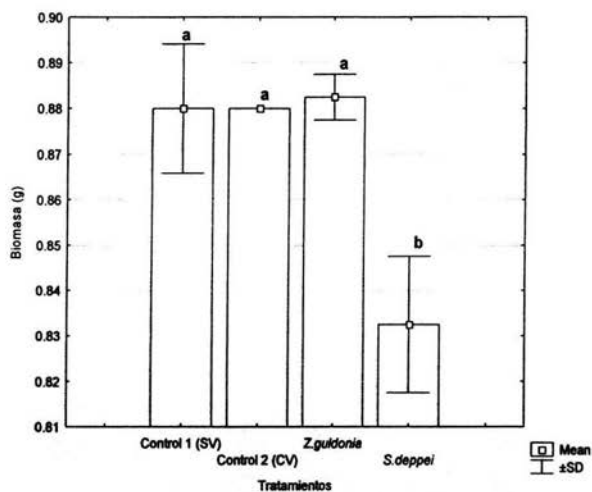


Figura 10. Efecto del estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *S. deppei* y *Z. guilonia* en el suelo, sobre la biomasa del frijol después de 10 días de crecimiento. Letras diferentes son estadísticamente significativas.

3. ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA CLONA Pvltip-24

La detección de la expresión del DNAc de la proteína Pvltip-24 en la raíz y las hojas de frijol, se realizó por medio de un análisis de Northern blot. La expresión de Pvltip-24 aumenta ligeramente en las hojas de frijol expuesto al estrés aleloquímico de *S. deppei*. Sin embargo, no se observó su expresión en la raíz bajo ningún tratamiento (Figura 11).

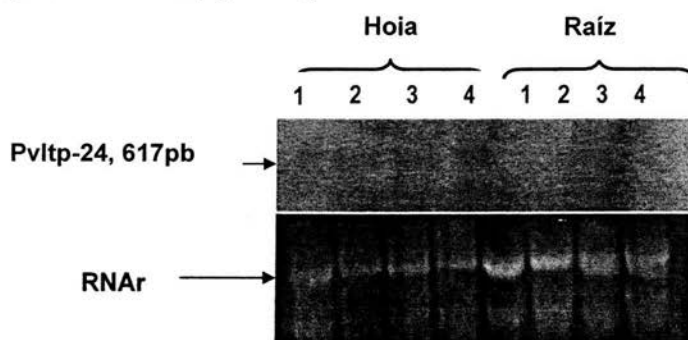


Figura. 11. Expresión de la clona Pvltip-24 en hojas y raíces de frijol expuesto al estrés aleloquímico. Se utilizaron 25 μg de RNA total por cada tratamiento. Control 1 (1), control 2 (2), *Z. guidonia* (3) y *S. deppei* (4).

El análisis por Northern blot de la proteína Pvltip-24 mostró que ésta se expresa marcadamente en el tallo del frijol expuesto al estrés aleloquímico de *S. deppei* y en menor grado con *Z. guidonia* (Figura 12).

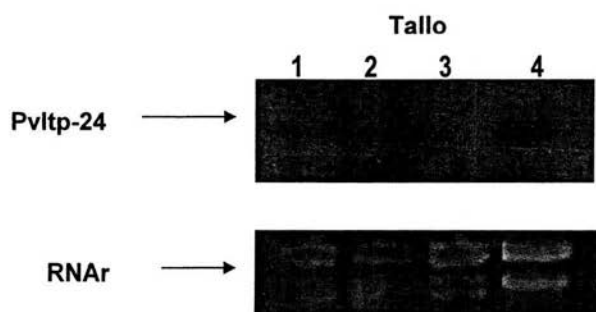


Figura. 12. Expresión de la clona PvItp 24 en el tallo de frijol expuesto al estrés aleloquímico causado por *S. deppei* y por *Z. guidonia*, después de 10 días de crecimiento. Se utilizaron 25 μ g de RNA total por cada tratamiento. Control 1 (1), Control 2 (2), *Z. guidonia* (3), *S. deppei* (4).

4. ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA CLONA Pvlea-18.

Los análisis por Northern blot mostraron que Pvlea-18 solo se expresa en la raíz del frijol expuesta al efecto del estrés aleloquímico causado por *S. deppei* y *Z. guidonia* (Figura 13).

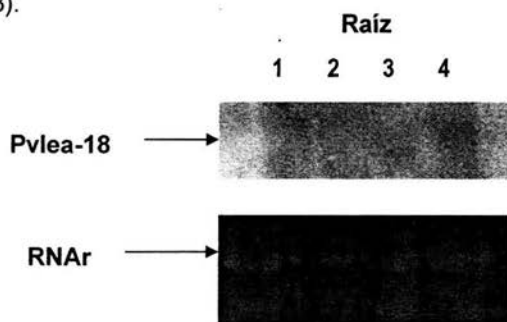


Figura 13. Expresión de la clona Pvlea-18 en la raíz de frijol expuesto al estrés aleloquímico causado por *S. deppei* y por *Z. guidonia* después de 10 días de crecimiento. Se utilizaron 25 μ g de RNA total por cada tratamiento. Control 1 (1), Control 2 (2), *Z. guidonia* (3) y *S. deppei* (4).

5. EFECTO DE LOS LIXIVIADOS ACUOSOS DE *Sicyos deppei* y *Zuelania guidonia*, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA, EN RAIZ, TALLO Y HOJAS DE *Phaseolus vulgaris*.

5.1 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA.

Para determinar el efecto del estrés aleloquímico de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre la actividad de la catalasa en la raíz, tallo y hojas del frijol, se realizaron geles nativos y también un método espectrofotométrico. Los geles nativos mostraron que la actividad de la catalasa en las hojas aumentó con el estrés aleloquímico de *S. deppei* y *Z. guidonia* y disminuyó en el control 2 (con vermiculita); en el tallo, no se observaron diferencias en ninguno de los tratamientos y en la raíz, la actividad aumentó en el control 2 (con vermiculita) y en el tratamiento con *S. deppei* (Figura 14). La tabla 5 muestra la actividad de la catalasa medida por espectrofotometría, en ésta se observa que en la hoja la actividad aumentó significativamente un 17 % con *Z. guidonia* y un 20 % con *S. deppei* con respecto al Control 1, la disminución de la actividad en el control 2 no fue estadísticamente diferente del control 1. Sin embargo, en el tallo, el control 2 (con vermiculita) y el tratamiento con *Z. guidonia* la actividad aumentó significativamente 13.5 % y 11 % respectivamente. En la raíz también se observó un aumento significativo de la actividad en el control 2 (106 %) con respecto al control 1. El aumento de la actividad en el tallo y en la raíz de las plantas del control 2 (con vermiculita) pudo deberse a la manipulación o daño mecánico que se les ocasionó a las raíces cuando se lavaron para remover la vermiculita.

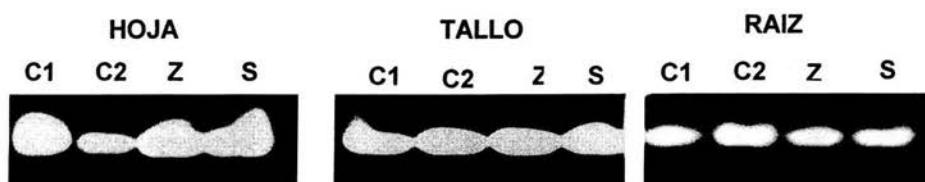


Figura 14. Geles nativos (zimogramas) de la actividad de la catalasa en hojas, tallo y raíz de frijol con los cuatro tratamientos. Se utilizaron 25 μ g de proteína para cada tratamiento. Control 1 (C1), Control 2 (C2), *Z. guidonia* (Z) y *S. deppei* (S).

Tabla 5. Efecto del estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *Z. guidonia* y *S. deppei* sobre la actividad de la catalasa en hojas, tallo y raíz de frijol. La actividad se reporta como nmol H₂O₂ consumido por minuto por mg de proteína.

Actividad de la Catalasa (nmol mg ⁻¹ min ⁻¹)			
	HOJA	TALLO	RAÍZ
Control 1	9.5±0.372(a)	5.11±0.03896(a)	8.413±0.8.4(a)
Control 2	7.1±0.420(a)	5.8±0.4.298(b)	17.3±5.133(b)
<i>Z. guidonia</i>	11.07±0.94(b)	5.68±0.08.07(b)	8.19±0.0819(a)
<i>S. deppei</i>	11.45±1.2(b)	5.3±0.006.99(a)	9.4±0.5545(a)

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Duncan (p<0.05)

Tabla 6. Efecto del estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *Z. guidonia* y *S. deppei* sobre la peroxidación de lípidos en hojas, tallo y raíz de frijol.

LIPOPEROXIDACIÓN (A _{233nm})			
	HOJA	TALLO	RAÍZ
Control 1	0.134±0.042(a)	0.359±.0291(a)	0.274±0.070(a)
Control 2	0.261±0.018 (b)	0.260±0.020(b)	0.233±0.047(a)
<i>Z. guidonia</i>	0.161±0.007(a)	0.363±0.059(a)	0.287±0.034(a)
<i>S. deppei</i>	0.155±0.003(a)	0.347±0.047(a)	0.278±0.0150(a)

En la medición de dienos conjugados, formados durante la peroxidación de lípidos se pudo observar que en las hojas de frijol del control 2 (con vermiculita) hubo un aumento significativo de 95 % en la lipoperoxidación, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los demás tratamientos. En el tallo se observó una disminución significativa del 28 % en el control 2; y en la raíz no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 7. Efecto del estrés aleloquímico causado por la descomposición de la parte aérea seca de *Z. guidonia* y *S. deppei* sobre la producción de radicales libres.

RADICALES LIBRES (cpm/mg proteína)			
	HOJA	TALLO	RAÍZ
Control 1	1542736 (a)	1159367.6 (a)	22311946.5 (a)
Control 2	1709491 (a)	1600164.8 (b)	24028836.8 (a)
<i>Z. guidonia</i>	2194887 (b)	2212783.9 (c)	35045917.2 (b)
<i>S. deppei</i>	2321875 (b)	3241472.2 (d)	34903346.3 (b)

La producción de radicales libres en las hojas de frijol aumentó 1.4 veces con el tratamiento con *Z. guidonia* y 1.5 veces con el de *S. deppei* con respecto al control 1. En el tallo los radicales libres aumentaron 2 y 2.9 veces con *Z. guidonia* y *S. deppei* respectivamente, y también se observó un aumento de 1.4 veces en el control 2; por último, en la raíz se presentó un aumento de 1.5 veces en ambos tratamientos, *S. deppei* y *Z. guidonia*. El aumento en radicales libres y la disminución de lipoperoxidación en el tallo en el control 2 (con vermiculita) pudo deberse a la misma razón del aumento de la actividad de la catalasa, o sea, el daño mecánico causado por la manipulación durante la limpieza de las raíces.

DISCUSIÓN

Frente a los diferentes factores de estrés ambiental, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de tolerancia, los cuales pueden incluir cambios morfológicos, estructurales, bioquímicos y moleculares. En el presente trabajo se describen los efectos del estrés aleloquímico causado por los lixiviados acuosos y la descomposición en el suelo de la parte aérea de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre el crecimiento, la expresión de dos genes de defensa (Pvltp-24 y Pvlea-18), la actividad de la enzima antioxidante catalasa, la formación de radicales libres y la lipoperoxidación en las hojas, tallo y raíz del frijol.

BIOENSAYOS *in vitro*.

Los resultados de los experimentos *in vitro* mostraron que el lixiviado de *Sicyos deppei* inhibió significativamente (50 %) el crecimiento de la raíz de *Phaseolus vulgaris*. En estudios anteriores Hernández-Bautista, *et al.* (1996), Cruz-Ortega, *et al.* (1998) y Romero-Romero (2000) reportaron que el lixiviado acuoso de *S. deppei* inhibe el crecimiento de las raíces de plantas cultivadas y de malezas, entre estas plantas están: calabaza (*Cucurbita pepo*), maíz (*Zea mays*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), chilacayote (*Cucurbita ficifolia*), lechuga (*Lactuca sativa*), amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y pasto elefante (*Echinochloa crus-galli*), lo que concuerda con el efecto fitotóxico de *S. deppei* observado en el presente trabajo. Por otro lado, los resultados obtenidos con el lixiviado de *Z. guidonia* fueron opuestos a lo reportado en trabajos anteriores. En el presente estudio el lixiviado inhibió 26.3 % el crecimiento de la raíz del frijol a las 48 horas, en cambio, Flores-Carmona (2004) reportó que el lixiviado de *Z. guidonia* estimulaba en un 14 % el crecimiento de la raíz del mismo frijol pero a las 72 horas de crecimiento. Asimismo, en un estudio fitoquímico biodirigido encaminado a la identificación de los compuestos bio-activos de *Z. guidonia* (Hernández-Maqueda, 2004) se aislaron dos saponinas triterpénicas cuya actividad se manifestó únicamente sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (*Fusarium sporotrichioides* y *Alternaria solani*); actualmente dicho estudio se está

continuando para poder corroborar la estructura propuesta por Hernández Maqueda (op cit.) e identificar otros compuestos con actividad biológica.

Los bioensayos *in vitro* de laboratorio son herramientas útiles en la evaluación preliminar del potencial aleloquímico de una planta, un extracto, o bien de un compuesto puro, pero es muy importante que éstos sean complementados con estudios realizados en el invernadero o en el campo para confirmar el potencial alelopático en condiciones naturales (Vyvyan, 2002).

EXPERIMENTO EN EL INVERNADERO

Este experimento se llevó a cabo para medir el estrés aleloquímico producido por la descomposición en el suelo de macetas de la parte aérea de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre el crecimiento del frijol y sobre algunos parámetros bioquímicos y moleculares. Los resultados mostraron que el crecimiento del frijol en el tratamiento con *S. deppei* fue menor con respecto al control. En éste tratamiento las plantas disminuyeron en área foliar (32 %), el crecimiento de la raíz fue inhibido (37 %) y la biomasa se redujo (6 %). Estos resultados confirman que los compuestos liberados durante la descomposición de la parte aérea de *S. deppei* tienen un efecto fitotóxico significativo sobre el frijol en condiciones de invernadero. El hecho de que el crecimiento de la raíz fuera significativamente inhibido por el estrés aleloquímico producido por *S. deppei*, puede sugerirnos que la absorción de los nutrimentos y del agua pudo haberse afectado, generando una deficiencia nutricional que se vio reflejada en el pobre crecimiento de la planta. Como se sabe la absorción de los nutrimentos es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, y se ha observado que varios aleloquímicos causan una alteración en la asimilación de éstos, ya sea, por una disminución en la disponibilidad de nutrimentos en el suelo (mineralización o inmovilización), o bien, por una alteración en la capacidad de las plantas para absorberlos del suelo.

Por el contrario, algunos parámetros evaluados en los frijoles que crecieron en el tratamiento con *Z. guidonia* mostraron valores mayores que los del control. En este tratamiento aumentaron tanto el área foliar (35 %) como el crecimiento de

la raíz (35 %): sin embargo, no hubo ningún efecto sobre la biomasa del frijol. Estos resultados, en el invernadero, concuerdan con los obtenidos por Flores-Carmona (2004). En este caso, la estimación observada nos sugiere que la planta de frijol asignó mayores recursos al crecimiento de la raíz y a la expansión de las hojas en el tratamiento con *Z. guidonia*. Una posible explicación es que el frijol, al tener un sistema radicular más desarrollado, pudo absorber mejor el agua y los nutrimentos, lo cual causó una mayor expansión de las hojas, y por lo tanto, una mayor tasa fotosintética; la cual, sin embargo, no se tradujo en una mayor biomasa. Por otro lado, se ha reportado que las hojas secas de *Z. guidonia* contienen una gran cantidad de taninos condensados, así como diterpenos (Khan, *et al.* 1990) y saponinas triterpénicas (Hernández-Maqueda, 2004). Algunos de estos terpenoides pudieron haber actuado como 'sustancias reguladoras del crecimiento' del frijol, provocando los cambios observados. Por ejemplo, las giberelinas, hormonas reguladoras del crecimiento, y que son una familia de diterpenos tetracíclicos, están relacionadas con el crecimiento de las plantas en procesos tales como germinación, elongación del tallo, floración, desarrollo de los frutos y regulación de la expresión de genes (Gomi y Matsuoka, 2003). Posiblemente, la liberación de compuestos semejantes durante la descomposición de *Z. guidonia* en el suelo, pudieron estimular algunos procesos del desarrollo del frijol.

Otras investigaciones han mostrado resultados semejantes a los observados en este trabajo, Kormawa, *et al.* (1999) reportan la estimulación de la biomasa del maíz expuesta a las coberturas de hojas de *Gliricidia sepium* y de *Leucaena leucocephala*. En un estudio en el invernadero, Caamal-Maldonado, *et al.* (2001) observaron que la biomasa del maíz y de algunas malezas se inhibió significativamente por la descomposición de hojas secas de *Canavalia ensiformis* y de *Lysiloma latissiliquum* incorporadas al suelo. En conclusión, podemos decir que el proceso de descomposición de la materia orgánica y la liberación de sustancias bioactivas durante el mismo, es un proceso sumamente complejo, donde están involucrados, entre otros factores, las características del suelo, la

época del año, el clima, los microorganismos, el estado fenológico y de salud de la planta productora y la reactividad de la planta receptora.

Los efectos observados en el crecimiento del frijol, tanto la inhibición causada por *S. deppei* como la estimulación por *Z. guidonia* se deben a alteraciones en el metabolismo del frijol. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar algunas de las respuestas metabólicas del frijol frente al estrés aleloquímico causado por la descomposición de plantas con potencial alelopático, y así poder entender mejor los mecanismos de acción de este factor de estrés. Por esto, se evaluaron la expresión de proteínas de defensa o indicadoras de estrés, y si se generaba o no un estrés oxidativo en la planta como respuesta al estrés causado por *Z. guidonia* y *S. deppei*.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS.

Proteínas de transferencia de lípidos.

Como se mencionó en la introducción las proteínas transportadoras de lípidos (PTL) tienen funciones muy importantes dentro de la célula. Por ejemplo se ha propuesto que participan en la biogénesis de la membrana, en la estructuración de la pared celular y en la formación de la cutina. Asimismo, se ha observado que estas proteínas aumentan su expresión en condiciones ambientales adversas como en el estrés hídrico y en respuesta a patógenos (Kader, 1996). En este trabajo, se analizó por Northern blots la expresión del DNAc de la proteína PvltP-24, en las hojas, tallo y raíz del frijol de todos los tratamientos. La expresión de PvltP-24 del frijol expuesto al estrés aleloquímico causado por *S. deppei* aumentó ligeramente en las hojas y más notablemente en el tallo, pero no se observó expresión en la raíz. Asimismo, la expresión de esta proteína con el tratamiento de *Z. guidonia* se observó en tallo y ligeramente en hojas pero no en raíz. Como se mencionó, el estrés aleloquímico inducido por *S. deppei* causó una inhibición del crecimiento del frijol, por lo que el aumento en la expresión de la proteína PvltP-24 en el tallo, posiblemente se puede considerar como una respuesta de defensa ante este tipo de estrés; lo que podría ayudar a la planta a seguir creciendo (a una tasa baja) en condiciones adversas. Se ha reportado que el RNAm de la PvltP-24

se acumula en el tallo y en las hojas, pero no en la raíz del frijol expuesto a un estrés hídrico (Colmenero-Flores, *et al.* 1997). Como se mencionó anteriormente, los metabolitos liberados por la descomposición de *S. deppei* pueden afectar la absorción de agua, generando en la planta un estrés hídrico. Romero-Romero (2003) encontró que el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa efectos similares al estrés hídrico en jitomate. Por otro lado, Molina, *et al.* (1993) en un estudio con plántulas de maíz y Guiderdoni, *et al.* (2002) con arroz, reportaron que las PTL se acumulan en las hojas en respuesta a la inoculación con hongos patógenos; lo que apoya nuestra hipótesis sobre que el frijol está activando mecanismos de defensa 'generales' durante el estrés aleloquímico; este tipo de defensas, aunque no actúan de manera específica contra el estrés aleloquímico, si lo hacen como una 'anticipación' a un ataque por patógenos, ya que, bajo condiciones de estrés aleloquímico, la planta puede ser mas susceptible a las infecciones.

Proteínas de embriogénesis tardía LEAs.

Se han identificado proteínas del tipo LEA, en varias especies vegetales. Estas proteínas son inducidas en la planta por varios factores de estrés como el frío, la deshidratación y la salinidad, entre otros, y se ha sugerido que pueden contribuir a la tolerancia de la planta hacia estos tipos de estrés. Durante los períodos de sequía las proteínas LEA pueden contribuir a la tolerancia de la célula a la deshidratación, a través de la alteración del potencial hídrico, promoviendo la absorción de agua y controlando la acumulación de iones (Bray, 1993). En el presente trabajo se analizó la expresión del gen de la Pvlea-18, ésta fue mayor en las raíces de frijol expuestas al estrés de *S. deppei*, y solo se expresó ligeramente en las raíces expuestas a *Z. guidonia*. El estrés aleloquímico causado por *S. deppei* inhibió el crecimiento de la raíz del frijol, y como mencionamos, pudo afectar la absorción de agua, generando en la planta un déficit hídrico y por consiguiente la expresión de la Pvlea-18. Aunque el hecho de haberse expresado no significa, necesariamente, que le proporcione tolerancia a la planta frente al estrés aleloquímico. Se sabe que hay genes cuya expresión aumenta debido al daño ocasionado por algún factor de estrés, sin que estos proporcionen

resistencia a la planta afectada (Bray, 1993). Colmenero-Flores, *et al* (1997 y 1999) observaron que el transcrito y la proteína de Pvlea-18 se expresan en la embriogénesis, durante las primeras etapas de la germinación y en las raíces de plántulas de frijol expuestas a estrés hídrico, principalmente en las regiones de crecimiento (meristemas). Los autores sugieren que esta proteína puede tener un papel de protección o retención de agua, previniendo la cristalización de proteínas celulares y otras moléculas durante la desecación. Moreno-Fonseca, *et al.* (2001) observaron también que la expresión de éste gen aumenta en las raíces de *Arabidopsis* en estado de deshidratación.

La expresión de proteínas de estrés como la Pvltp-24 y la Pvlea-18 durante un estrés aleloquímico, sugiere que los compuestos bioactivos de *S. deppei*, y los de *Z. guidonia* están generando cambios o alteraciones a nivel de la expresión genética de la planta.

ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se pueden generar como productos del metabolismo normal de las células (por ejemplo durante la fotosíntesis y la respiración), pero también sus niveles pueden aumentar en respuesta a condiciones de estrés (biótico y abiótico). Actualmente se considera a los ROS como indicadores de condiciones de estrés y como mensajeros secundarios involucrados en las vías de señalización para la activación de genes de defensa, o bien, como inductores de la muerte celular programada (ver Mittler, 2002). Las células cuentan con sistemas o mecanismos antioxidantes para regular los niveles de ROS y prevenir el daño causado por ellos. Dentro de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes están la SOD (superóxido dismutasa), la catalasa y la ascorbato peroxidasa. Para determinar si el estrés aleloquímico causaba un daño oxidativo al frijol, se midió la formación de radicales libres, la actividad de la catalasa, como modelo de los mecanismos antioxidantes, y los niveles de lipoperoxidación de las células en raíz, tallo y hojas.

La catalasa es una proteína que reduce la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células, pues éste es tóxico para la mayoría de ellas, a una concentración de 10 a 100 μM . El efecto de la descomposición de las hojas secas de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre la actividad de la catalasa en la raíz, tallo y hojas del frijol, se determinó por geles nativos y por espectrofotometría. Se observó que la actividad de la catalasa aumenta en las hojas del frijol expuestas al estrés aleloquímico de *S. deppei*, pero no en tallo y raíz. Ahora bien, los niveles de radicales libres aumentaron significativamente en hojas (53 %), tallo (190 %) y raíz (59 %), pero no observamos un efecto en la lipoperoxidación en ninguno de los tres órganos (Tabla 7). Estos resultados nos sugieren que la presencia de los alelopáticos de *S. deppei* durante el desarrollo del frijol, podrían causar una alteración del sistema antioxidante. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios donde se produce un aumento en los radicales libres debido al estrés aleloquímico (Ayala-Cordero, 2001 y Romero-Romero, 2003). Este aumento en ROS podría estar relacionado con la nutrición de la planta; sobre este aspecto Malusá *et al.* (2002) reportaron que la deficiencia de fósforo en las raíces de *P. vulgaris* aumenta dos veces la producción de radicales libres con respecto al control. En otro estudio donde la producción de ROS fue monitoreada por una sonda fluorescente (diclorofluoresceína, DCF), se mostró que la (-)-catequina induce en 10 s, el incremento de ROS en las raíces de *Centaurea difusa* y de *Arabidopsis thaliana* (Bais, *et al.* 2003).

En relación con el efecto de la descomposición de *Z. guidonia* sobre el frijol, se observó que la actividad de la catalasa de las hojas y del tallo aumentó significativamente con este tratamiento. De igual modo, los radicales libres aumentaron en las hojas (42%) en el tallo (100%) y en la raíz (59%). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la lipoperoxidación de las hojas, tallo y raíz bajo este tratamiento. Al igual que en el caso del tratamiento con *S. deppei*, el aumento en la actividad de la catalasa, el no presentar lipoperoxidación y la gran cantidad de radicales libres podrían indicar que el daño ocasionado por las ROS es compensado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares (catalasa) y los mecanismos de recambio y reparación. Los mecanismos

antioxidantes son muy diversos, y en cada organismo, célula y tejido predominan algunos sobre otros ayudando a mantener el estado redox celular (Hansberg, 2002), por lo que sería necesario profundizar en el estudio del efecto de éste estrés sobre la actividad de otras enzimas antioxidantes y de las respuestas generadas por los radicales libres formados.

Los efectos observados en las plantas de frijol del Control 2 (con vermiculita): el aumento en la actividad de la catalasa en raíz y tallo, la disminución de la lipoperoxidación en tallo y hoja y el aumento de los radicales libres en el tallo, probablemente fueron causados por el daño mecánico provocado durante la manipulación en la limpieza de la planta. Se ha reportado que un daño mecánico como las heridas pueden causar el aumento de radicales libres (Dat, *et al*, 2000).

Finalmente, este trabajo es una demostración completa del fenómeno de la alelopatía: inhibición y estimulación del crecimiento. Por un lado, *S. depppei* produjo cambios a nivel morfológico, bioquímico y molecular en la planta de prueba (el frijol), los cuales se tradujeron en una disminución del crecimiento de esta planta. Por el otro, *Z. guidona*, causó cierta estimulación del crecimiento del frijol, ocasionando también cambios a nivel bioquímico y molecular.

CONCLUSIONES

Tabla 8. Resumen del efecto de la descomposición de la parte aérea seca de *S. deppei* y *Z. guidonia* sobre el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.

	<i>Sicyos deppei</i>	<i>Zuelania guidonia</i>
Efecto en el área foliar	32 % ↓	36 % ↑
Crecimiento de tallo y raíz	37 % ↓	35 % ↑
Biomasa	6 % ↓	0 %
Crecimiento	28 % ↓	16 % ↑

Tabla 9. Resumen del efecto de la descomposición de *S. deppei* y *Z. guidonia* en los niveles de radicales libres, daño a la membrana (lipoperoxidación), actividad de la catalasa y en la expresión de proteínas de defensa (LTP y LEA) (-) Datos no significativos.

	<i>Sicyos deppei</i>			<i>Zuelania guidonia</i>		
	Hoja	Tallo	Raíz	Hoja	Tallo	Raíz
Radicales libres	50 % ↑	180 % ↑	56 % ↑	42 % ↑	90 % ↑	56 % ↑
Lipoperoxidación	—	—	—	—	—	—
Catalasa	20 % ↑	—	—	17 % ↑	14 % ↑	—
LPT	↑	↑	—	↑	↑	—
LEA	—	—	↑	—	—	↑

Las principales conclusiones del trabajo y que se resumen en las tablas 8 y 9 son las siguientes:

1. En los bioensayos *in vitro*, el crecimiento radicular del frijol es inhibido significativamente por el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei*, pero no se ve afectado por el lixiviado de *Zuelania guidonia*.

2. En el experimento en el invernadero, el estrés aleloquímico causado por las hojas secas de *S. deppei*, incorporadas al suelo de las macetas, inhibieron significativamente el crecimiento del frijol, observándose una inhibición de la raíz, una disminución en el área foliar y en la biomasa. Por el contrario, el estrés aleloquímico causado por las hojas secas de *Z. guidonia* ocasionó una estimulación significativa en el crecimiento del frijol reflejada en una mayor área foliar, un mayor crecimiento de la raíz y pero no en la biomasa.
3. El análisis por Northern blot mostró que la clona de la proteína transportadora de lípidos (Pvltp-24) se expresó en hojas y tallo de la planta de frijol expuesta al estrés aleloquímico de *S. deppei* y de *Z. guidonia*, pero no se observó expresión en la raíz. En cambio, la clona de la proteína LEA (Pvlea-18) se expresó únicamente en la raíz de *P. vulgaris* expuesta al estrés aleloquímico de *S. deppei*.
4. El estrés aleloquímico de *S. deppei* causó un estrés oxidativo reflejado en un aumento en la actividad de la catalasa en las hojas del frijol (20 %), un aumento en los niveles de radicales libres en la hoja (50 %), en el tallo (180 %) y en la raíz (56 %), aunque no se observó lipoperoxidación en ninguno de los tres tejidos.
5. El estrés aleloquímico de *Z. guidonia* también aumentó la actividad de la catalasa en la hoja (17 %) y en el tallo (14 %); los niveles de radicales libres aumentaron 42 % en la hoja, 90 % en el tallo y 56 %, en la raíz, y tampoco se observó lipoperoxidación en ninguno de los tres tejidos.
6. Este estudio ha demostrado que los compuestos aleloquímicos de *Sicyos deppei* y *Zuelania guidonia* produjeron una inhibición y una estimulación respectivamente del crecimiento del frijol. También le causaron un daño oxidativo, el cual se manifestó en el aumento de los niveles de radicales libres y en la actividad de la enzima antioxidante catalasa, y en la inducción de la expresión de genes de defensa. Por lo que podemos decir que la hipótesis fue confirmada.

REFERENCIAS

- Abei, H. 1974. Catalase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) Verlag Chamie, Weinheim, Alemania. pp 673-684.
- 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: 611-624.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing; New York and London pp 1294.
- Anaya, A.L. 2003. *Ecología Química*. Plaza y Valdez Editores. México D.F. pp 349.
- 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.
- Anaya, A.L., Espinosa-García, F., y Cruz-Ortega, R. 2001. *Relaciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. Editores Plaza y Valdés- Instituto de Ecología. pp 733.
- Ayala-Cordero, G. 2001. Efecto del Estrés Aleloquímico Producido por *Callicarpa acuminata* sobre el Patrón de Proteínas y la Actividad de la Catalasa en las raíces de *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicon esculentum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Bais, H., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. y Vivanco, J. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.
- 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.
- Bidwell, R. 1979. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, S. A, México D.F. pp 687-702.

- Blokhina, O. 2000. Anoxia and Oxidative Stress: Lipid Peroxidation, Antioxidant Status and Mitochondrial Functions in Plants. PhD dissertation thesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Helsinki. Diciembre 2000.
- 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. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2 (1): 48-54.
- Bray, A.E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Buchanan. B., Gruissen, W. y Jones, R. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologist*, Rockville, M.D. pp 1367.
- Caamal-Maldonado, J. A., Jimenez Osornio, J.J., Torres-Barragán, A. y Anaya, A.L. 2001. The Use of allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. *Agronomy J.* 93: 27- 36
- 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. 1995. Effect of phytotoxic resin glucoside on activity of H⁺-ATPase from plasma membrane. *J. Chem. Ecol.* 21 (3): 289-297.
- Cano-Camacho-H, Zavala, G. Lozoya, E. 1995. La defensa química de las plantas, *Ciencia.* 46: 64-73.
- Carballeira, A. y Reigosa, M.J. 1999. Effects of natural leachates of *Acacia dealbata*. Link in Galicia (NW Spain). *Bot. Bull. Academia Sinica* 40: 87-92.
- Chary, P. y Natving, D.O. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*. Effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* 171: 2646-2652.
- Colmenero-Flores, J. M., Moreno, L. P. Smith, C. E. y Covarrubias, A. 1999. Pvlea-18, a member of a new Late-Embryogenesis-Abundant protein family that

- accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings, *Plant Physiol.* 120: 93–103.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., García-Rubio, A. y Covarrubias, A.A 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol. Biol.* 35: 393-405.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. pp 1262.
- 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., Sánchez-Nieto, S. y Jiménez, M. 1990. Effect of dyacetil piquerol on H⁺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 ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *J. Chem. Ecol.* 24 (12): 2039-2057.
- Dat, J., Vandenabeele, S. Vranová E., Montagu, M, Inze D., Breusegemn, V. 2000 Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life.Sci* 57: 779-795.
- Devi, R.S., Pellissier, F. y Prasad, M.N.V. 1997. *Allelochemicals*. Prasad M.N.V. (Ed). Plant Ecophysiology. Jonh Wiley and Sons. Inc. New York. pp 253-304.
- Devi, S.R. y Prasad, M.N.V. 1992. Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. *J. Chem. Ecol.* 18: 1981-1990.
- Devi, S.R. y Prasad, M.N.V. 1996. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biol. Plant.* 38 (3): 387-395.
- Dunaeva, M. y Adamska, I. 2001. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur. J. Biochem* 268: 5521- 5529.

- Einhellig, F. A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. En: The Science of Allelopathy. Eds. Putman, A.R. y Tang, C-S. John Wiley & Sons, Inc. USA. 171-188.
- Farrell, R.E. 1998. RNA methodologies a laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press. Harcourt Brace & Company Publisher. San Diego California. pp 533.
- Flores-Carmona, M.C. 2004. Potencial de bioactividad de algunas especies arbóreas de la reserva natural El Edén, en Quintana Roo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Foyer, C y Noctor G, 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plantarum* 119: 355-364
- Galindo. J.C.G, Hernández, A., Dayan, F.E., Téllez, M.R., Macias, F.A. y Duke S.O. 1999. Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenoide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochemistry* 52: 805-813.
- Gomi, K. y Matsuoka, M. 2003. Gibberelin signaling pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 6:489-493.
- Gonzalez, V.M., Casimir, J., Nimbai, C., Weston, L.A. y Cheniae, G.M. 1997. Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. *J Agric Food Chem.* 45:1415-1421.
- Guideroni, E., Cordero, M.J., Florence, V., Garcia-Garrido, J.M., Lescot, M., Tharreau, D., Meynard, D., Ferriere, N., Jean-Loupotteghem y Delseny, M. 2002. Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice *Ltp1* gene. *Plant Mol. Biol.* 49: 683-699.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals biology and medicine*. Clarendon, Press Oxford. pp 543.
- Hansberg, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico. Vol XXVI. Depto de Bioquímica Facultad de Medicina. UNAM. 35pp.
- Harris, H. y Hopkinson, D. A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pp 1-2.

- Hernández- Maqueda. J. 2004. Potencial aleloquímico de *Zuelania guidonia* (Sw) Britton & Millsp (Flacourtiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Hernández-Bautista, B.E., Torres-Barragan, 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.
- IAS (Internacional Allelopathy Society). Constitution and Bylaws. First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future Cadiz, Spain. September 1996.
- Inderjit y Duke, S. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 1-23.
- Juszczuk, I., Malusà, E. y Rychter A.M. 2000. Oxidative stress during phosphate deficiency in roots of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Plant Physiol.* 158: 1299-1305.
- Kader, J.C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 627-54.
- Khan, M.R., Gray A.I., Reed, D. R., Sadler I. y Waterman, P.G. 1990. Diterpenes from *Zuelania guidonia*. *Phytochemistry* 29 (5):1609-1614.
- Kormawa, P. M., Kamara, A.Y, Jutzi, S.C. y Sanginga, N. 1999. Economic evaluation of using mulch from multi-purpose trees in maize-based production systems in South Western Nigeria. *Experimental Agriculture* 35 (1): 101-109.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larcher, W. 1995. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Third Edition. Springer. Berlin. Pp 506.
- Li, H.H., Nishimura, H., Hasegawa K. y Mizutani, J. 1993. Some physiological effects and the possible mechanism of action of juglone in plants. *Weed Res Japan.* 38:214-222
- Malusa, E., Laurenti, E., Juszczuk, I., Pia, R. y Rychter, A. 2002. Free radical production in roots of *Phaseolus vulgaris* subjected to phosphate deficiency stress. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 963-967.

- Mann, J. Secondary metabolism. 1987. Segunda edición, Oxford Chemistry Series. pp 133.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plants Science* 7 (9): 405-410.
- Molina, A, y Garcia-Olmedo, F. 1993. Lipid transfer proteins (nspLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plants pathogens. *FEBS Lett.* 316:119-122.
- 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, D.C. 330: 247-261.
- Moreno-Fonseca, L.P. y Covarrubias, A. 2001. Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Mol Biol* 45: 501-515.
- Pennington, T.D. y Sarukhán, J. 1998. Árboles Tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM y Fondo de Cultura Económica. México. pp 521.
- Priestley, D.A 1986. Seed ageing: loss of seed quality in storage. Chapter 3. Comstock Publishing Associates A division of Cornell University Press. Ithaca y Londres.
- Putman, A.R. y Tang C.S. 1986. The science of allelopathy. Wiley, New York
- Recknangel, R.O y Glende, E.A. 1984. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in Enzymol.* 105: 331-337.
- Reigosa, M. y Pedrol, N. 2002. Allelopathy from Molecules to Ecosystems. *Science Publishers, Inc, Enfield USA.* 231-269.
- Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A. y González, L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Plant Science* 18 (5): 577-608.
- Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed., Academic Press, London 422 pp.
- Romagni, J., Allen, S. y Dayan, F. 2000. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *J. Chem. Ecol.* 26: 303-310.

- Romero-Romero, M.T. 2000. Efecto del estrés aleloquímico provocado por los metabolitos secundarios de las plantas alelopáticas sobre el patrón de síntesis de proteínas de la raíz de *Cucurbita pepo* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Zea mays* L., y *Lycopersicon esculentum* L. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Romero-Romero, T. 2003. Estudio comparativo entre el efecto del estrés aleloquímico y el estrés hídrico en las raíces de *Lycopersicon esculentum* L. (Solanaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring. New York, USA.
- Taiz, L y Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. 690pp.
- Tukey, H.B. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *Bot. Rev.* 35: 1-16.
- Vyvyan, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*. 58 (9): 1631-1646.
- Wink, M. y Latz-Brüning, B. 1995. Allelopathic properties of alkaloids and other natural products: possible modes of action. En: Inderjit, Dakshini, K.M.M. y Einhellig, F.A (eds). *Allelopathy: organisms, processes and applications*. American Chemical Society, Washington DC, pp 117-126.
- Yu, J.Q. y Matsui, Y. 1994. Phytotoxic substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J.Chem.Ecol.* 20: 21-31.
- Zhang, Y., Chai T., Dong J., Zhao., W., Chen T. y Burkard, G. 2001. Cloning and expression analysis of the heavy-metal responsive gene PvSR2 from bean. *Plant Science* 161: 783-790.
- Zolman, J.F. 1993. *Biostatistics Experimental Design and Statistical Inference*. Oxford University, New York. pp 343.