

13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

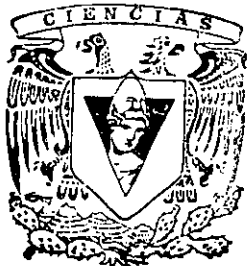
FACULTAD DE CIENCIAS

288841

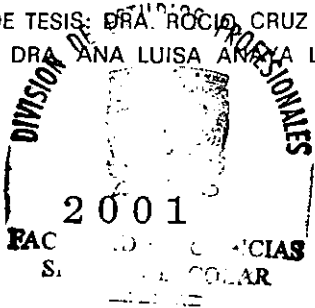
EFFECTO DEL ESTRES ALELOQUIMICO PRODUCIDO POR Callicarpa acuminata, SOBRE EL PATRON DE PROTEINAS Y LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA EN RAICES DE Zea mays, Phaseolus vulgaris y Lycopersicon esculentum

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BIOLÓGICA PRESENTA: GABRIELA AYALA CORDERO



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





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto del estrés aleloquímico producido por Callicarpa acuminata,
sobre el patrón de proteínas y la actividad de la catalasa en raíces
de Zea mays, Phaseolus vulgaris y Lycopersicon esculentum.

realizado por : Gabriela Ayala Cordero

con número de cuenta : 8811759-7 , pasante de la carrera de : Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Rocío Cruz Ortega

Rocío Cruz Ortega

Propietario

Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Ana Luisa Anaya Lang

Propietario

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Sobeida Sánchez Nieto

Suplente

Dra. Patricia Tato Zaldivar

Patricia Tato Zaldivar

Suplente

Dra. Alma Orozco Segovia

Alma Orozco Segovia

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz



DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

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*

Gabriela Ayala Cordero

Dedicatoria

A mis padres Virginia y Emiliano, por su cariño y comprensión.

A mi abuelita Consuelo por estar con nosotros.

A mis hermanos

Gabriel, Arturo, Alejandra, Lucia, Irma, Alejandro, José Luis y Adriana, por todo su cariño y por compartir esos momentos especiales, gracias por su apoyo.

A mis sobrinos

Aurea, Samantha, Erel, Axel, Ana, Paola, Alejandro y Luis, porque son un camino de esperanza y amor.

A Alejandro, por este tiempo compartido, por su amistad y su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, por su apoyo y sus comentarios para la realización de este trabajo.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Rocío Cruz Ortega, por su apoyo, tiempo y enseñanzas que me dio para la realización de este trabajo.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, por su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Tato Zaldivar y la Dra. Alma Orozco Segovia, por sus revisiones y comentarios en este trabajo.

A mis amigas:

Angélica, Jaina, Elia, Alejandra, Marithza, Dolores, Lilia y Clara, por esos años compartidos y su amistad

A Blanca y la señora Guadalupe, por todo su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio:

Tony, Aurora, Abigail, Teresa, Juan Fernando, José y Fernando, por sus consejos en el trabajo y su apoyo.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias:

David, Juanita, Alfredo, Alejandra Serrato, Paula, Teresa, Enrique, Roberto, Rafael y Francisco, por su apoyo y amistad.

A mis amigos de la Secundaria "171":

Muy especialmente al Profesor Miguel Francisco, por sus consejos y su amistad. A Queta, Gloria y Amparo, por el apoyo recibido y su amistad.

A mis amigos del Museo.

Isabel, Enrique y Karina, por ese tiempo compartido y su gran amistad.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología con el apoyo económico del proyecto 400346-5-25316N del CONACYT y del proyecto IN-217796 de la DGAPA.

CONTENIDO

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
DEFINICIÓN DE ALELOPATÍA	4
Naturaleza química y biosíntesis de los compuestos aleloquímicos	5
Rutas de liberación	6
Regulación de la liberación de los aleloquímicos	8
EFFECTO DE LOS ALELOQUÍMICOS SOBRE PROCESOS CELULARES	9
ESTRÉS BIOLÓGICO	12
Proteínas de estrés	14
Estrés oxidativo	15
Peroxidación de lípidos	15
Mecanismo de defensa contra las especies reactivas de oxígeno	16
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	17
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
MATERIAL BIOLÓGICO Y BIOENSAYOS	20
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	21
ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)	22
MICROSECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS	24
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA EN GELES NATIVOS Y POR ESPECTROFOTOMETRÍA	26
MEDICIÓN DE RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACIÓN	28
RESULTADOS	30
EFECTO DEL LIXIVIADO DE <i>CALLICARPA</i> SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR, EL PATRÓN DE PROTEÍNAS DE <i>ZEA MAYS</i> , <i>LYCOPERSICON</i> <i>ESCULENTUM</i> Y <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	30
EFECTO DEL LIXIVIADO DE <i>CALLICARPA</i> SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA, RADICALES LIBRES Y DIENOS CONJUGADOS EN LAS RAÍCES DE <i>ZEA MAYS</i> , <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> Y <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

Callicarpa acuminata Kunth (Verbenaceae) es una especie que tiene un alto potencial aleloquímico. Los diversos metabolitos secundarios bioactivos presentes en *Callicarpa* producen un estrés aleloquímico sobre diversos organismos, incluyendo plantas cultivadas. El presente trabajo describe el efecto del lixiviado acuoso de la parte aérea de *Callicarpa acuminata* sobre el crecimiento radicular, el patrón de proteínas y la actividad de la catalasa (como respuesta a una producción de radicales libres), en tres plantas cultivadas de prueba: jitomate, frijol y maíz. El efecto del lixiviado acuoso al 1% inhibió significativamente el crecimiento radicular del jitomate pero no tuvo un efecto sobre el crecimiento del frijol y del maíz. El efecto de éste lixiviado fue evaluado sobre el patrón de proteínas de la raíz de las plántulas de los tres cultivos, utilizando la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE). El análisis por densitometría de láser mostró que el lixiviado tuvo un efecto diferencial sobre el patrón de expresión de varias proteínas en las tres plantas cultivadas. En el jitomate, aunque el efecto general fue una disminución de la expresión de ciertas proteínas, una proteína de 27.5 kD aumentó significativamente. La secuencia de la amino terminal (23 aminoácidos) de ésta proteína mostró una similitud de 90-95% con las enzimas 'glutatió-S-transferasa' de otras plantas. El patrón de proteínas de las raíces de frijol también se modificó por efecto del lixiviado; las proteínas en el frijol, aumentaron o disminuyeron. La secuencia de la terminal amino de una proteína de 11.3 kD, que aumentó significativamente, fue similar en un 94% al inhibidor de la α -amilasa del mismo frijol. Ambas proteínas están relacionadas con mecanismos de defensa de las plantas frente a condiciones adversas. Por otro lado, se midió la actividad de la catalasa tanto en geles nativos como por espectrofotometría en las raíces de los tres cultivos tratadas con el lixiviado acuoso de *Callicarpa*. La actividad de la catalasa aumentó en las raíces de frijol y de jitomate, pero no en las de maíz. La técnica de quimioluminiscencia para medir radicales libres, indicó que en el jitomate y frijol, el aumento se debió al efecto del lixiviado acuoso de *Callicarpa*, lo que se relaciona con el aumento de la actividad de la catalasa. También se determinó el grado de lipoperoxidación por medio de la producción de dienos conjugados. El lixiviado de *Callicarpa* aumentó 2.4 veces la lipoperoxidación en las raíces de jitomate, sin aumentarla en frijol y en maíz. Se concluye que el jitomate es la planta más sensible al estrés aleloquímico causado por el lixiviado de *Callicarpa acuminata*; además, sus respuestas son diferentes a las observadas en el maíz y en el frijol, por lo tanto, el estrés aleloquímico causado por las moléculas biodinámicas contenidas en el lixiviado acuoso de *Callicarpa acuminata* tiene un efecto diferencial.

INTRODUCCIÓN

DEFINICIÓN DE ALELOPATÍA

El campo de la ecología química comprende el estudio de las relaciones planta-insecto, planta-microorganismo y planta-planta mediadas por compuestos químicos (infoquímicos¹) que son producidos por los organismos y liberados al medio, donde pueden actuar como atrayentes, estimulantes o inhibidores para otros organismos. Estas relaciones químicas son de fundamental importancia para la sobrevivencia de los organismos y para la dinámica y el equilibrio de la comunidad (Anaya, 1999).

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, literalmente significaría *el efecto perjudicial de un organismo sobre otro*. El fenómeno de la alelopatía es complejo y su definición ha ido cambiando con el tiempo. Inicialmente, fue definida como: *"cualquier efecto perjudicial, directo o indirecto, de una planta sobre otra, a través de la producción de compuestos químicos liberados al medio ambiente"* (Rice, 1984). Recientemente, en la primera reunión internacional de alelopatía se definió a ésta como: *"cualquier proceso que involucra la producción de metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos, los cuales influyen en el crecimiento y desarrollo de otros organismos (excluyendo a los animales)"* (IAS, 1996). En las interacciones alelopáticas están involucrados varios elementos, entre los cuales tenemos: la planta *donadora* de los compuestos químicos, las características del suelo u otro substrato (agua), los microorganismos que pueden ser los receptores y modificadores de estos compuestos, y las *plantas receptoras* de los compuestos químicos liberados o bien modificados por la población de microorganismos (Figura 1).

¹ Los *infoquímicos* son de dos tipos: *aleloquímicos*, aquellos que median relaciones químicas entre organismos de diferente especie, y *feromonas*, los que median relaciones químicas entre los organismos de la misma especie.

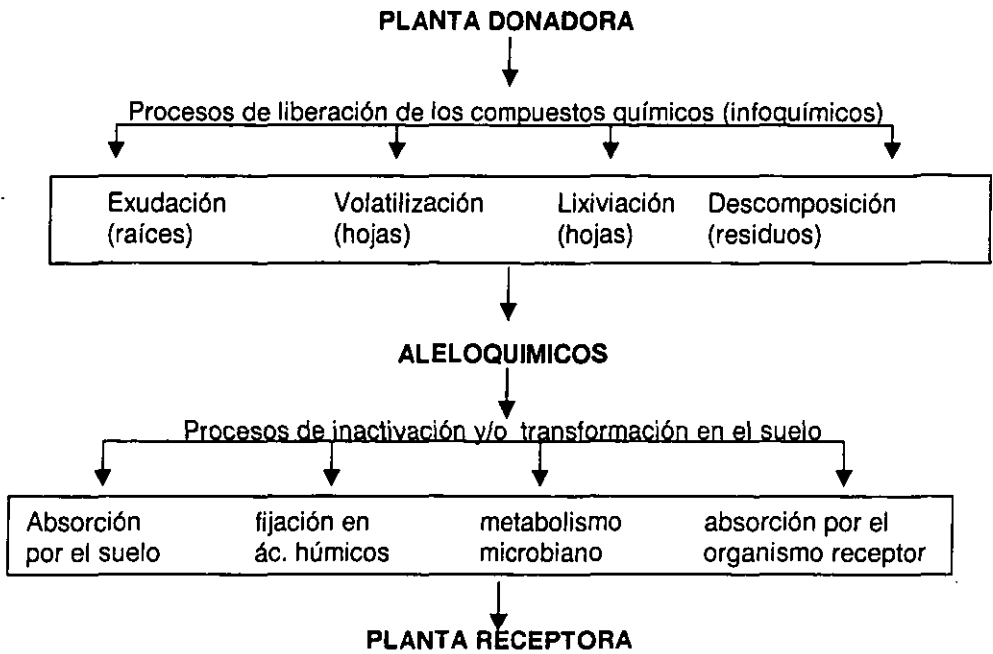


Figura 1. Procesos que los compuestos aleloquímicos pueden tener antes de llegar a una planta receptora. La mayoría de estos procesos están regulados por las condiciones ambientales (tomado de Reigosa, 1999)

Naturaleza química y biosíntesis de los compuestos aleloquímicos.

La mayoría de los compuestos químicos involucrados en la alelopatía, pertenecen a los metabolitos secundarios, llamados así porque, en general, no tienen un papel bioquímico primario como lo tienen las proteínas, los ácidos nucleicos, los carbohidratos y los lípidos (metabolitos primarios) (Granados et al., 1989). Los metabolitos secundarios pertenecen a diversos grupos químicos, desde simples compuestos alifáticos hasta complejos compuestos aromáticos. Algunos ejemplos son: los ácidos acético y butírico, ciertas quinonas, fenoles simples, derivados de

ácidos fenólicos como los ácidos cinámico y benzoico, cumarinas, flavonoides, taninos hidrolizables y condensados, terpenoides y alcaloides, entre muchos otros.

Los metabolitos secundarios principalmente se derivan de dos vías: la del acetato y la del ácido shikímico (Rice, 1984). Los derivados del acetato son: los terpenoides, los esteroides, los flavonoides, los ácidos orgánicos solubles en agua, cadenas de alcoholes, las acetonas, los ácidos grasos insaturados simples, los poliacetilenos, las naftoquinonas, las antraquinonas, las quinonas y el floroglucinol. Los derivados del ácido shikímico incluyen: los fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, las cumarinas, los glucósidos, los alcaloides y las cianohidrininas, algunos derivados de las quinonas y los taninos hidrolizables y condensados.

Rutas de liberación.

Las rutas de liberación de los compuestos aleloquímicos dependen de (1) su naturaleza química, (2) si están unidos con otras moléculas, y (3) de su localización en la célula vegetal (Mandava, 1985). Algunos metabolitos secundarios pueden ser tóxicos para la misma planta que los produce, en este caso la planta los almacena dentro de las vacuolas, en los pelos glandulares, en las células muertas como el duramen de la madera, o bien los libera al exterior. De acuerdo con Tukey (1969) existen principalmente cuatro rutas de liberación de los compuestos aleloquímicos, las cuales son:

1. Volatilización. Esta forma de liberación está relacionada principalmente con los compuestos volátiles, por ejemplo, terpenos y monoterpenos, como el α - y el β -pineno, el alcanfor y el cíneol, entre otros (Fischer et al., 1994). Estos compuestos volátiles pueden ser absorbidos por otras plantas a través del vapor o el rocío condensado, o pueden llegar al suelo, donde son adsorbidos por las partículas del suelo o absorbidos por las raíces de otras plantas. Por ejemplo, los monoterpenos liberados de las hojas del eucalipto, los cuales llegan al suelo y son tóxicos para la germinación y el crecimiento de otras plantas (Del Moral y Muller, 1970).

2. **Lixiviación.** Los aleloquímicos pueden ser lavados o lixiviados de la planta por la acción de la lluvia, la nieve, la niebla, el rocío o la flovizna. Los aleloquímicos liberados por esta vía incluyen sustancias orgánicas e inorgánicas como los fenoles, terpenos y alcaloides (Rice, 1984). Se ha demostrado, tanto en el campo, como en el laboratorio, que muchos de estos compuestos 'lixiviados' tienen un efecto tóxico sobre las plantas circundantes y los microorganismos (Macias et al., 1994).
3. **Exudación por la raíz.** Los compuestos aleloquímicos también pueden ser exudados o liberados por la células de la raíz de varias plantas. Se ha reportado que los exudados de las raíces de pepino (*Cucumis sativus*, L.) contienen ácidos orgánicos como el benzoico, p-hidroxibenzoico, 2-5 dihidroxibenzoico, 3-fenilpropanoico, cinámico, p-hidroxicinámico, mirístico, palmítico y el ácido esteárico, los cuales son tóxicos para el crecimiento de las semillas de lechuga (Yu y Matsui, 1994). Einhelling (1987) considera que factores como la edad de la planta, los nutrimentos, la luz y la humedad influyen tanto cualitativa como cuantitativamente en la exudación de los compuestos aleloquímicos.
4. **Descomposición de los residuos vegetales.** Los residuos de las plantas al descomponerse proporcionan una gran cantidad de aleloquímicos a la rizósfera (Devi et al., 1997). Los factores que influyen en este proceso, incluyen la naturaleza de los residuos, el tipo de suelo y las condiciones ambientales (Mason-Sedum et al., 1986). Los compuestos liberados al suelo pueden ser químicamente transformados por los microorganismos y convertirse en compuestos biológicamente más activos (Devi et al., 1997). La descomposición de los residuos de sorgo libera los ácidos clorogénico, cumárico, hidroxibenzoico y el vainílico, los cuales inhiben el crecimiento del girasol, jitomate y rábano (Nicollier et al., 1985).

Las cuatro rutas de liberación de los aleloquímicos se muestran en la Figura 2.

LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS

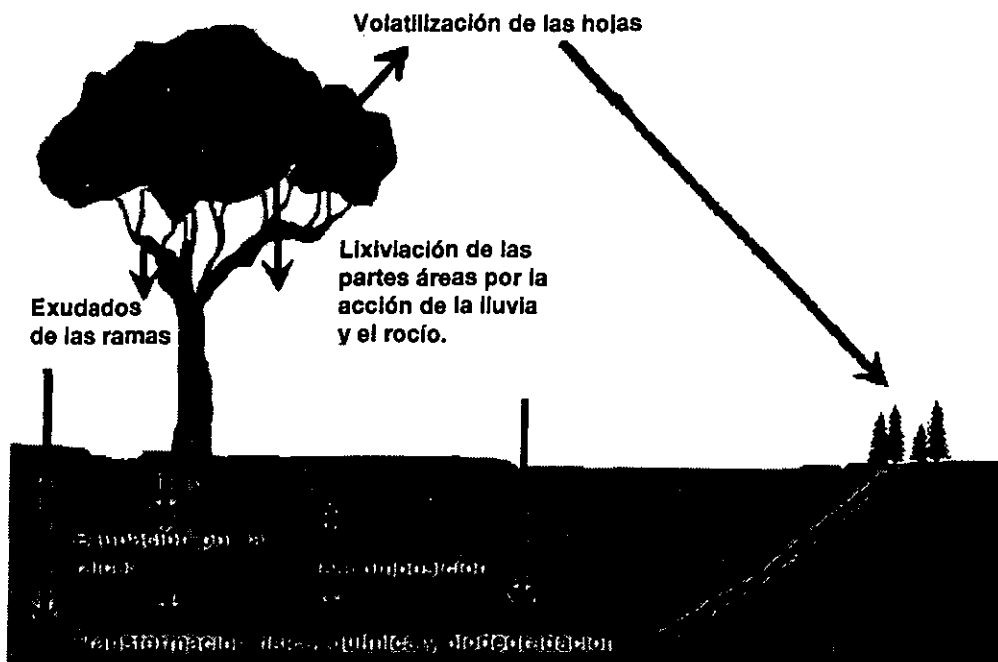


Figura 2.- Métodos de liberación de los aleloquímicos al medio ambiente (tomado de Reigosa, 1999)

Regulación de la liberación de los aleloquímicos:

La síntesis, la cantidad, la liberación y la toxicidad de los aleloquímicos pueden estar influenciados por varios factores abióticos como la luz, la temperatura y las condiciones del suelo (Berg, 1986). Downum (1992) reporta que en algunas angiospermas, la luz acelera la liberación de acetofeninas, furanocumarinas y furanoquinonas. Einhelling y Ecrich (1984) mencionan que las temperaturas altas (30-35 °C) aumentan el efecto biológico de los compuestos aleloquímicos del sorgo. La textura del suelo también influye en la toxicidad de los aleloquímicos, la mayoría

de los compuestos volátiles son adsorbidos por las partículas coloidales del suelo y pueden permanecer en forma activa por periodos prolongados (Muller y del Moral, 1966). La cantidad de oxígeno en el suelo es un factor importante en la transformación, acumulación y persistencia de los compuestos aleloquímicos. Bajo condiciones aeróbicas la descomposición de los compuestos orgánicos por los microorganismos es muy rápida, en cambio bajo condiciones anaeróbicas se favorece la producción de compuestos como el metano, el etileno, los ácidos acético, láctico y butírico y varios compuestos fenólicos, los cuales se ha demostrado que son tóxicos para las plantas (Chou et. al., 1977 y Chou y Chiou, 1979). Por otro lado, el pH del suelo también influye en la liberación de los aleloquímicos, en suelos con un pH ácido (< 6.0), la descomposición de los residuos disminuye y, por lo tanto, la liberación de los aleloquímicos (Berg,1986).

EFFECTO DE LOS ALELOQUÍMICOS SOBRE PROCESOS CELULARES

Los efectos visibles de los compuestos aleloquímicos sobre la germinación y el crecimiento de las plantas receptoras, son la manifestación de los efectos primarios que tienen sobre procesos celulares específicos. Son varios los procesos celulares que pueden ser afectados por los compuestos aleloquímicos en la planta receptora. A continuación se describen algunos de éstos procesos:

CRECIMIENTO Y DIVISIÓN CELULAR. Se ha reportado que varios compuestos aleloquímicos afectan el crecimiento de varias especies de plantas, inhibiendo el crecimiento radicular, la expansión foliar y causando un marchitamiento de la planta. Existen varios trabajos donde se muestra que los procesos de división celular y elongación son inhibidos por la acción de los compuestos aleloquímicos (Devi et al., 1997). Holappa y Blum (1991) reportan que el ácido ferúlico inhibe el crecimiento radicular y la expansión foliar de plántulas de pepino y jitomate. Se ha observado que el ácido ferúlico forma uniones éster con los polisacáridos de la pared celular de

de los compuestos volátiles son adsorbidos por las partículas coloidales del suelo y pueden permanecer en forma activa por periodos prolongados (Muller y del Moral, 1966). La cantidad de oxígeno en el suelo es un factor importante en la transformación, acumulación y persistencia de los compuestos aleloquímicos. Bajo condiciones aeróbicas la descomposición de los compuestos orgánicos por los microorganismos es muy rápida, en cambio bajo condiciones anaeróbicas se favorece la producción de compuestos como el metano, el etileno, los ácidos acético, láctico y butírico y varios compuestos fenólicos, los cuales se ha demostrado que son tóxicos para las plantas (Chou et. al., 1977 y Chou y Chiou, 1979). Por otro lado, el pH del suelo también influye en la liberación de los aleloquímicos, en suelos con un pH ácido (< 6.0), la descomposición de los residuos disminuye y, por lo tanto, la liberación de los aleloquímicos (Berg,1986).

EFFECTO DE LOS ALELOQUÍMICOS SOBRE PROCESOS CELULARES

Los efectos visibles de los compuestos aleloquímicos sobre la germinación y el crecimiento de las plantas receptoras, son la manifestación de los efectos primarios que tienen sobre procesos celulares específicos. Son varios los procesos celulares que pueden ser afectados por los compuestos aleloquímicos en la planta receptora. A continuación se describen algunos de éstos procesos:

CRECIMIENTO Y DIVISIÓN CELULAR. Se ha reportado que varios compuestos aleloquímicos afectan el crecimiento de varias especies de plantas, inhibiendo el crecimiento radicular, la expansión foliar y causando un marchitamiento de la planta. Existen varios trabajos donde se muestra que los procesos de división celular y elongación son inhibidos por la acción de los compuestos aleloquímicos (Devi et al., 1997). Holappa y Blum (1991) reportan que el ácido ferúlico inhibe el crecimiento radicular y la expansión foliar de plántulas de pepino y jitomate. Se ha observado que el ácido ferúlico forma uniones éster con los polisacáridos de la pared celular de

las células del coleóptilo de avena (*Avena sativa* L.), lo cual hace rígidas a las células, causando una inhibición en el crecimiento celular (Kamisaka et al., 1990).

INTERACCIÓN CON HORMONAS. Muchos compuestos aleloquímicos interactúan con los reguladores del crecimiento de las plantas. Los taninos inhiben el crecimiento inducido por el ácido giberélico, provocando la reducción de la síntesis de amilasa y de la ácido fosfatasa en el endospermo de la semilla de cebada (Devi et al., 1997). Devi y Prasad (1992) reportan una similar inhibición de enzimas hidrolíticas en semillas de maíz tratadas con ácido ferúlico. La inhibición del crecimiento de semillas de pepino y jitomate por compuesto fenólicos ha sido relacionada con un aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA) (Holappan y Blum, 1991). En otro estudio, Ishii y Saka (1992) reportan que la elongación de las células del hipocótilo del arroz, mediada por el ácido indolacético (IAA), fue inhibida por el ácido ferúlico.

ENZIMAS. Algunos aleloquímicos pueden modificar directamente la síntesis y la actividad de varias enzimas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos aleloquímicos pueden regular la actividad de las enzimas de dos maneras: a bajas concentraciones tienden a aumentar su actividad, y a altas a inhibirla (Devi et al., 1997). En semillas de maíz tratadas con ácido ferúlico, se ha observado un aumento en la actividad de enzimas oxidativas como peroxidasas, catalasas y la IAA oxidasa (Devi et al., 1997). También en el maíz tratado con ácido ferúlico se ha reportado una inhibición de la actividad de enzimas hidrolíticas, como las amilasas, la maltasa, varias proteasas y la fosfatasa ácida; éstas enzimas están involucradas en la movilización del material de reserva y los autores relacionan estos cambios con la inhibición del crecimiento (Devi y Prasad, 1992).

RESPIRACIÓN. Los compuestos aleloquímicos alteran la respiración dependiendo de su naturaleza química, de su concentración y de la etapa de desarrollo de la planta. Los aleloquímicos pueden inhibir el transporte de electrones al oxígeno, o bien desacoplar la fosforilación oxidativa. Cruz-Ortega et al., (1988) encontraron que el

extracto etanólico de polen de maíz inhibió el transporte de electrones en mitocondrias aisladas de hipocótilos de sandía. Hejl et al., (1993) reportan que la juglona actuó como un desacoplante en mitocondrias aisladas de soya (*Glicine max*) Peñuelas et al., (1996), utilizando mitocondrias aisladas de cotiledones de soya, probaron el efecto de la juglona, la quercetina, el ácido cinámico y el α -pineno sobre la tasa de respiración y el reparto de los electrones a través de las vías del citocromo y de la cadena alterna de oxidación. Los autores reportaron que solo el ácido cinámico y el α -pineno inhibieron la tasa del consumo de oxígeno y aumentaron el reparto relativo del transporte de electrones a la cadena alterna, los otros aleloquímicos solo tuvieron efecto sobre la vía del citocromo.

FOTOSÍNTESIS. La inhibición del crecimiento, y por lo tanto de la biomasa de las plantas, debido al efecto de los aleloquímicos, puede estar relacionada con una alteración de la fotosíntesis. La escopoletina, un derivado de la cumarina, inhibió la producción de biomasa, la expansión del área foliar y la tasa fotosintética en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), de girasol (*Helianthus annuus* L.) y de amaranto (*Amaranthus retroflexus* L.) (Einhellig et al., 1970). Patterson (1981) reportó que los ácidos ferúlico, cinámico, *p*-cumarico, vainíllico y gálico, a una concentración de 1000 μ M, inhiben la tasa fotosintética en semillas de soya. Devi et al., (1997), experimentando con plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico, observaron una disminución de la asimilación de CO₂ y de la conductividad estomática. En otros estudios, Calera et al., (1995 a y b, 1996) reportaron que la isoalloalantolactona, aislada de *Ratibida mexicana*, inhibió la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, alterando el flujo de protones y el transporte de electrones en el fotosistema II (P680).

PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA. Se ha reportado que varios derivados fenólicos, flavonoles y flavonoides, alteran las propiedades de las membranas (Moreland y Novitzky, 1987). El efecto de estos compuestos sobre la absorción, respiración y fotosíntesis, se debe muchas veces a la alteración que producen sobre la integridad

estructural y funcional de la membrana (Devi et al., 1997). Varios compuestos como los derivados del ácido cinámico y del benzoico, depolarizan la membrana y su efecto depende de su solubilidad en los lípidos de la misma (Glass, 1973). En un estudio reciente, Galindo et al., (1999) mostraron que la dehidrozaluzanina C, una lactona sesquiterpénica, provocó una salida rápida de iones en membranas aisladas de cotiledones de pepino.

ESTRÉS BIOLÓGICO

El estrés se define como cualquier factor biótico o abiótico que puede alterar significativamente un proceso fisiológico en el organismo afectado. La respuesta inmediata de las plantas a un factor de estrés puede ser una inhibición de su desarrollo. Las plantas han desarrollado una alta capacidad para enfrentarse a diferentes factores de estrés utilizando varios mecanismos de respuesta que operan a diferentes tiempos y que dependen de la naturaleza, de la intensidad y del tiempo de exposición al estrés, así como del proceso fisiológico involucrado. Estos mecanismos de respuesta son compensatorios y en muchas ocasiones le permiten a la planta mantener una tasa constante de un proceso fisiológico aún bajo condiciones de estrés (Larcher, 1995).

Los factores abióticos que pueden ocasionar un estrés son: 1) el clima, como la temperatura, la humedad, la radiación y el viento; 2) condiciones edafológicas, como altas concentraciones de sales, deficiencias o excesos de nutrimentos, acidez o alcalinidad, altas concentraciones de metales como Cd^{+2} , Al^{+3} , y Cu^{+2} (Larcher, 1995). Por otro lado, dentro de los factores bióticos que causan estrés en las plantas podemos mencionar: 1) la sobrepoblación, 2) la competencia, 3) los patógenos (insectos, microorganismos; diversos nemátodos), 4) herbívoros, y 5) interacciones químicas, por ejemplo, las alelopáticas (estrés aleloquímico). Dentro de estos factores también se encuentra el antropogénico como la contaminación (plaguicidas y fertilizantes), los desechos industriales y los incendios, entre muchos otros (Larcher, 1995) (Figura 3).

estructural y funcional de la membrana (Devi et al., 1997). Varios compuestos como los derivados del ácido cinámico y del benzoico, depolarizan la membrana y su efecto depende de su solubilidad en los lípidos de la misma (Glass, 1973). En un estudio reciente, Galindo et al., (1999) mostraron que la dehidrozaluzanina C, una lactona sesquiterpénica, provocó una salida rápida de iones en membranas aisladas de cotiledones de pepino.

ESTRÉS BIOLÓGICO

El estrés se define como cualquier factor biótico o abiótico que puede alterar significativamente un proceso fisiológico en el organismo afectado. La respuesta inmediata de las plantas a un factor de estrés puede ser una inhibición de su desarrollo. Las plantas han desarrollado una alta capacidad para enfrentarse a diferentes factores de estrés utilizando varios mecanismos de respuesta que operan a diferentes tiempos y que dependen de la naturaleza, de la intensidad y del tiempo de exposición al estrés, así como del proceso fisiológico involucrado. Estos mecanismos de respuesta son compensatorios y en muchas ocasiones le permiten a la planta mantener una tasa constante de un proceso fisiológico aún bajo condiciones de estrés (Larcher, 1995).

Los factores abióticos que pueden ocasionar un estrés son: 1) el clima, como la temperatura, la humedad, la radiación y el viento; 2) condiciones edafológicas, como altas concentraciones de sales, deficiencias o excesos de nutrimentos, acidez o alcalinidad, altas concentraciones de metales como Cd^{+2} , Al^{+3} , y Cu^{+2} (Larcher, 1995). Por otro lado, dentro de los factores bióticos que causan estrés en las plantas podemos mencionar: 1) la sobrepoblación, 2) la competencia, 3) los patógenos (insectos, microorganismos; diversos nemátodos), 4) herbívoros, y 5) interacciones químicas, por ejemplo, las alelopáticas (estrés aleloquímico). Dentro de estos factores también se encuentra el antropogénico como la contaminación (plaguicidas y fertilizantes), los desechos industriales y los incendios, entre muchos otros (Larcher, 1995) (Figura 3).

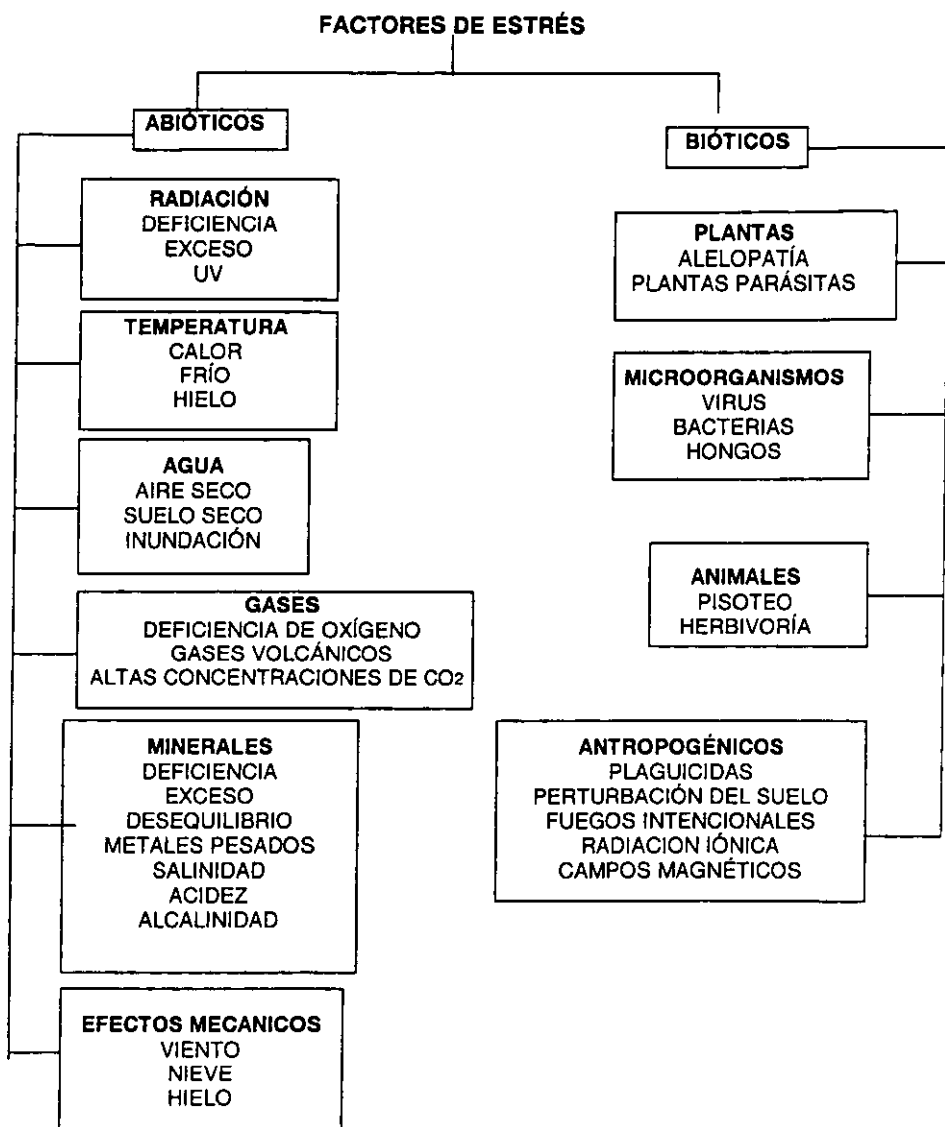


FIGURA 3. Factores causantes de un estrés en el medio ambiente (tomada de Larcher, 1995).

Proteínas de estrés

Las respuestas de las plantas a los diferentes factores de estrés dependen de sus características genéticas particulares, las cuales les confieren el grado de sensibilidad y/o tolerancia que tengan a estos factores. Estas respuestas pueden ser parte de los mecanismos que permitan a la planta resistir a los factores de estrés, o bien, ser una manifestación del daño celular que han experimentado por efecto del mismo. Tanto los mecanismos de tolerancia como el daño causado involucran cambios en la expresión genética. Estos cambios se pueden manifestar como un aumento o disminución de metabolitos, enzimas, o bien, síntesis de nuevas proteínas. La síntesis de estas últimas puede ser específica para un factor de estrés en particular (Ziegler, 1990).

Para observar los cambios en el patrón de proteínas generados por el efecto de los factores de estrés, se ha hecho uso de la técnica de electroforesis, en particular de la técnica de dos dimensiones (2D-PAGE) (O'Farrel, 1975), que permite separar proteínas individuales; primero los polipéptidos son separados con base en su carga y después por su peso molecular. En numerosos estudios se ha utilizado esta técnica para identificar proteínas que fueron modificadas por factores de estrés en las plantas. En un trabajo reciente, Riccardi et al., (1998) encontró que 78 proteínas fueron significativamente modificadas en el maíz durante un estrés hídrico. De éstas, 19 fueron secuenciadas y dos correspondieron a proteínas expresadas durante el estrés hídrico, RAB17 (responden al ABA) y ASR (proteína relacionada al ABA, al estrés hídrico y a la madurez) en embriones de maíz y plantas de jitomate respectivamente. La toxicidad por aluminio también induce cambios en el patrón de proteínas citoplásmicas del trigo (Ownby y Hruschka (1991). Posteriormente en esta misma planta, se identificó una proteína inducida por el aluminio (TAI-18); la secuencia de aminoácidos de esta proteína correspondió a una relacionada a la patogénesis (PR2) (Cruz-Ortega y Ownby, 1993). Otros trabajos reportan que las altas temperaturas inducen la síntesis de nuevas proteínas de estrés (proteínas de choque térmico o HSP) en varias especies vegetales (Key et al., 1981; Cooper y Ho, 1983; Vierling, 1991). Ricard et al., (1991) observaron que durante condiciones

anaeróbicas las raíces de maíz sintetizan proteínas como las SS1 y SS2, ambas isoenzimas de la sacarosa sintetasa.

Estrés oxidativo.

La mayoría de los factores que causan estrés a las plantas, como la temperatura (calor o frío), la falta de oxígeno, la deshidratación y la salinidad, ocasionan dentro de las células la formación de especies reactivas de oxígeno, produciendo lo que se conoce como estrés oxidativo. Este estrés se da cuando la producción de especies reactivas de oxígeno, EOR (radicales libres que tienen uno o más electrones desapareados), aumenta y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser ineficiente y, por lo tanto, causan un daño en las membranas de las células, el cual, si llega a ser muy severo, puede conducir a la muerte celular (Halliwell et al., 1995). Durante la fotosíntesis se pueden producir EOR cuando la cantidad de energía recibida por los pigmentos no puede ser almacenada fotoquímicamente, causando un daño en las membranas de los cloroplastos. Los átomos de oxígeno de las EOR son más inestables que el O_2 en su estado basal de energía (Halliwell y Gutteridge, 1984). Dentro de las especies de oxígeno reactivo más importantes están: el radical superóxido ($\bullet O_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el oxígeno singulete (1O_2), todas estas especies son citotóxicas y actúan de diversa manera en los diferentes organelos celulares.

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 de un grupo metilo adyacente a una doble ligadura y formando un radical libre orgánico. Este radical reacciona con el oxígeno y forma un peroxirradical, el cual a su vez reacciona con otro ácido graso vecino 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, propagando la reacción de peroxidación. La presencia de metales activos reductores, como son el Fe^{+2} y el Cu^{+2} , puede facilitar la iniciación del proceso (Yu, 1994; Aust, 1985).

La peroxidación de las moléculas de lípidos causa, invariablemente, cambios o daños en la estructura molecular lipídica. En las membranas la peroxidación de sus lípidos destruye el arreglo y organización estructural de la bicapa lipídica (Yu, 1994). Por otro lado, los productos de la lipoperoxidación tienen diversos efectos en las células: desnaturalizan el ADN e impiden la síntesis de proteínas; pueden provocar oxidación de aminoácidos, entrecruzamientos entre proteínas, inhibición de diversos eventos metabólicos como la respiración o la actividad de enzimas (Priestley, 1986).

Mecanismo de defensa contra las especies reactivas de oxígeno.

Evolutivamente los organismos han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse de los efectos perjudiciales del estrés oxidativo. Las plantas, además de sintetizar enzimas antioxidantes, sintetizan otros compuestos como las vitaminas E y C, los flavonoides, el β -caroteno y otras pequeñas moléculas con propiedades antioxidantes. Las defensas enzimáticas incluyen a las enzimas catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasa y otras enzimas reparadoras (Scandalios, 1997).

La catalasa (CAT) (H_2O_2 -oxido reductasa, EC 1.11.1.6) es una hemoproteína tetramérica que fue aislada y cristalizada por primera vez del tejido hepático por Sumner y Dounce (1937). La mayoría de las catalasas purificadas contienen cuatro subunidades, cada una con un peso molecular de 60 kD, un grupo hemo [Fe (III) protoporfirina] en el sitio activo y una molécula de NADPH (Halliwell y Gutteridge, 1989). En células vegetales y animales, la catalasa se encuentra en los peroxisomas, los cuales deben su nombre a que dentro de ellos se encuentran oxidasas que generan peróxido de hidrógeno tóxico y por lo tanto tienen que tener una enzima como la catalasa para eliminarlos (Subramani, 1993). La CAT cataliza la descomposición de peróxidos (H_2O_2 y hidroperóxidos) funcionando ya sea como

peroxidasa en presencia de donadores de protones (actividad peroxidica) (1) o descomponiendo el H_2O_2 en H_2O y O_2 (actividad catalásica) (2):



En maíz se han identificado y caracterizado tres isoenzimas de la catalasa en varios tejidos: CAT-1, CAT-2, CAT-3, las cuales son codificadas por tres genes estructurales: *cat1*, *cat2*, *cat3*. Su distribución está regulada tanto espacial como temporalmente en el desarrollo del maíz. CAT-1 es la única isoenzima expresada en el polen maduro, en el endospermo lechoso inmaduro, en el escutelo, la radícula y en la plántula durante la germinación de las semillas. Durante las primeras etapas germinativas, la CAT-1 es la enzima principal, pero conforme el embrión crece la CAT-2 llega a ser la isoenzima predominante. La CAT-3 se localiza principalmente en el coleoptilo y las hojas de las plantas (Redinbaugh et al., 1990). La expresión de las catalasas está también influenciada por factores como la luz, las hormonas, el ozono, la temperatura, así como por compuestos naturales tóxicos, lo que pone de manifiesto el papel protector de la catalasa en respuesta a un estrés oxidativo generado por estos factores.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En los estudios de alelopatía realizados en México, se han puesto en evidencia los potenciales fitotóxicos de diversas plantas, se han aislado e identificado los metabolitos secundarios responsables de la fitotoxicidad y se han estudiado algunos de los mecanismos de acción de estos compuestos. En el presente estudio, se eligió una especie con potencial alelopático, proveniente del sureste de México, *Callicarpa acuminata*. Kunth (Verbenaceae). Actualmente se está realizando un fraccionamiento biodirigido de esta especie, para identificar los compuestos o metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica observada en *C. acuminata*. Se

peroxidasa en presencia de donadores de protones (actividad peroxídica) (1) o descomponiendo el H_2O_2 en H_2O y O_2 (actividad catalásica) (2):



En maíz se han identificado y caracterizado tres isoenzimas de la catalasa en varios tejidos: CAT-1, CAT-2, CAT-3, las cuales son codificadas por tres genes estructurales: *cat1*, *cat2*, *cat3*. Su distribución está regulada tanto espacial como temporalmente en el desarrollo del maíz. CAT-1 es la única isoenzima expresada en el polen maduro, en el endospermo lechoso inmaduro, en el escutelo, la radícula y en la plántula durante la germinación de las semillas. Durante las primeras etapas germinativas, la CAT-1 es la enzima principal, pero conforme el embrión crece la CAT-2 llega a ser la isoenzima predominante. La CAT-3 se localiza principalmente en el coleoptilo y las hojas de las plantas (Redinbaugh et al., 1990). La expresión de las catalasas está también influenciada por factores como la luz, las hormonas, el ozono, la temperatura, así como por compuestos naturales tóxicos, lo que pone de manifiesto el papel protector de la catalasa en respuesta a un estrés oxidativo generado por estos factores.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En los estudios de alelopatía realizados en México, se han puesto en evidencia los potenciales fitotóxicos de diversas plantas, se han aislado e identificado los metabolitos secundarios responsables de la fitotoxicidad y se han estudiado algunos de los mecanismos de acción de estos compuestos. En el presente estudio, se eligió una especie con potencial alelopático, proveniente del sureste de México, *Callicarpa acuminata*. Kunth (Verbenaceae). Actualmente se está realizando un fraccionamiento biodirigido de esta especie, para identificar los compuestos o metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica observada en *C. acuminata*. Se

ha comprobado en diversos bioensayos *in vitro*, que *Callicarpa* contiene compuestos con actividad tóxica sobre varias especies de plantas como *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, sobre hongos fitopatógenos como *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium* sp, sobre *Artemia salina* e insectos como *Spodoptera*. Los compuestos que han sido identificados hasta ahora son principalmente diterpenos (α -amirina) y el ácido isopimárico, entre otros (Anaya y del Amo, 1999 y Anaya et al., en preparación). En otras especies del mismo género como *C. macrophylla* se han identificado el ácido L (+)- α -amino- β -(p-metoxifenil)-propiónico, la calliterpenona y su monoacetato, β -sitosterol- β -D-glucósido, ácido ursólico y ácido 2 α -hidroxiursólico, ácido cratególico, entre otros (Talapatra et al., 1994). Por otro lado, Kawazu et al., (1967 a y b) reportaron que el diterpeno tricarbóxico, callicarpona, aislado de *C. candicans*, es tóxico para los peces. Tanto los estudios fitoquímicos de *C. acuminata* realizados en el laboratorio, como los reportados en la literatura para otras especies, muestran que el género *Callicarpa* contiene metabolitos secundarios que causan un estrés aleloquímico a diversos organismos. Dentro de los estudios fitoquímicos biorientados es importante determinar el mecanismo de acción o el daño a los procesos metabólicos causados por los metabolitos secundarios o aleloquímicos en el organismo receptor. El presente estudio está enfocado a determinar algunos de los mecanismos de acción de los compuestos aleloquímicos de *Callicarpa acuminata* sobre plantas cultivadas. El objetivo general y los particulares fueron los siguientes:

Objetivo general

Determinar el efecto del estrés aleloquímico producido por *Callicarpa acuminata*, sobre el crecimiento radicular, el patrón de proteínas, la actividad de la catalasa, la peroxidación de lípidos y la formación de radicales libres en *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicon esculentum*.

Objetivos Particulares

1. Determinar cuantitativamente el efecto *in vitro* del lixiviado acuoso de la parte aérea de *Callicarpa acuminata* sobre el crecimiento radicular de las plantas cultivadas.
2. Evaluar los efectos del lixiviado acuoso de la parte aérea de *Callicarpa acuminata* sobre el patrón de proteínas de las raíces de las plantas cultivadas, por medio de la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE).
3. Analizar por densitometría, el patrón de proteínas de cada planta tratada con el lixiviado acuoso de *Callicarpa*, para determinar los cambios significativos ocasionados por éste.
4. Determinar los pesos moleculares de las proteínas modificadas significativamente por el lixiviado acuoso de *Callicarpa* en el frijol, maíz y jitomate, con el fin de comparar si los cambios causados en las tres plantas son similares o son selectivos.
5. Realizar la microsecuenciación de la amino terminal de proteínas que sean significativamente afectadas por el estrés provocado por *Callicarpa*.
6. Evaluar el efecto del lixiviado acuoso de *Callicarpa* sobre la actividad de la catalasa de las raíces del frijol, maíz y jitomate, tanto en geles nativos como por espectrofotometría.
7. Determinar el efecto del lixiviado acuoso de *Callicarpa* sobre la formación de radicales libres por quimioluminiscencia, y el grado de lipoperoxidación en las raíces de las plantas cultivadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO Y BIOENSAYOS

La especie alelopática utilizada para producir el estrés aleloquímico sobre las plantas cultivadas, *Callicarpa acuminata* Kunth. (Verbenaceae), fue colectada en la Reserva Ecológica 'El Edén', Quintana Roo, en donde es una especie con una amplia distribución en las comunidades vegetales secundarias.

Las semillas de las plantas cultivadas utilizadas como planta prueba fueron:

Zea mays L., Poaceae (Maíz H40)

Phaseolus vulgaris L., Fabaceae (Frijol flor de mayo)

Lycopersicon esculentum L., Solanaceae (Jitomate Río Grande).

BIOENSAYOS. Se realizaron bioensayos *in vitro* utilizando lixiviados acuosos al 1% de la parte aérea seca de *Callicarpa*. Estos bioensayos fueron hechos en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar. Los lixiviados se prepararon remojando 2g de la parte aérea de *Callicarpa* en 100 ml de agua destilada estéril durante 3 horas. El lixiviado se esterilizó por filtración con un aparato Millipore con una membrana de 45 μm de diámetro y posteriormente se determinó su presión osmótica con un osmómetro de punto de congelación (OSMETTE A), con el fin de no rebasar el límite de tolerancia de las semillas de prueba a este factor (Anaya y Pelayo-Benavides, 1997).

PROCESAMIENTO DE LAS SEMILLAS. Las semillas de maíz, frijol y jitomate se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos. Posteriormente, las semillas se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada estéril para quitarles cualquier residuo de esta solución.

GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS. En cada caja de petri (9 cm) se mezclaron 10 ml del lixiviado acuoso al 2% y 10 ml de agar al 2% (Merck) para obtener una concentración

final 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 cada planta de prueba por caja. Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron en una estufa de germinación a 27°C y en la oscuridad. Para las semillas de jitomate se utilizaron cajas de petri chicas (6 cm), a las cuales se les añadió 3 ml del lixiviado o de agua estéril y 3 ml de agar al 2%.

DISEÑO EXPERIMENTAL. Las cajas de petri se distribuyeron bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Después de 48 horas se determinó el porcentaje de germinación y se midió la longitud de las raíces de frijol y maíz, y después de las 72 horas las del jitomate. Los datos sobre crecimiento radicular fueron analizados por medio de un ANOVA ($p \leq 0.05$).

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

OBTENCIÓN DE RAÍCES. Para la extracción de proteínas de las raíces de maíz y de frijol se utilizaron 20-30 cajas de petri (9 cm) con 10-12 semillas cada una por tratamiento (control y lixiviado de *Callicarpa*); para el jitomate se utilizaron 30-40 cajas de petri (6 cm), con 10 semillas cada una, por tratamiento. Después del tiempo de incubación respectivo (48 h para el frijol y el maíz y 72 h para el jitomate), se cortaron los 5 mm de la punta de cada raíz y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, guardándose a -70 °C para su uso posterior.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLÁSMICAS DE LA RAÍZ DE LAS PLANTAS DE PRUEBA. Las raíces de las plantas de prueba tratadas con el lixiviado y las del control, se homogenizaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino; después se añadió un amortiguador de extracción [700 mM de Sacarosa (Sigma), 50 mM Trizma-base (Sigma), 30 mM HCl, 100 mM KCl, 5 mM Na₂EDTA (Sigma) y 2 mM

DTT² (Bio Rad)] (Barent y Elthon, 1992), en una relación de 1g de tejido por 4 ml de amortiguador. El tejido se terminó de homogenizar con un vástago de vidrio. El homogeneizado se centrifugó a 8,000 g durante 20 minutos a 4°C, por dos ocasiones, para remover los residuos celulares. Posteriormente, las proteínas del sobrenadante se separaron con fenol (J.T. Baker) saturado con agua en una relación 1:1, esta solución se mezcló con cuidado para combinar las dos fases y se incubó a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. Después se centrifugó a 5,000 g por 10 minutos para separar las fases. La fase orgánica con las proteínas se transfirió a un tubo limpio y éstas se precipitaron con acetato de amonio 0.1M (J.T. Baker) en metanol (J.T. Baker), en una relación 1:5, durante toda la noche a - 20 °C. Posteriormente se centrifugaron a 5,000 g por 10 minutos para concentrar las proteínas en un botón, el cual se lavó varias veces, primero con acetato de amonio 0.1 M en metanol y posteriormente con acetona fría (100 %) para quitar cualquier residuo de fenol. Las proteínas se disolvieron con un amortiguador para separación de proteínas por punto isoeléctrico (IEF) [Urea 9 M (Sigma), 4% de CHAPS³ (Bio-Rad), 0.5% de DTT (Bio-Rad), 2% de amfolitos de rango 5/7 (Bio-Rad) y 0.75% de amfolitos de rango 3/10 (Bio-Rad)] (Hurkman y Tanaka, 1988). La cantidad de proteína citoplásmica se determinó por el método de Bradford (1984).

ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)

Para comparar los cambios en el patrón de proteínas citoplásmicas de las raíces de las plantas del control con las del tratamiento de *Callicarpa*, se realizó la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) de acuerdo al método de O'Farrell (1975). En esta técnica la primera dimensión consiste en la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico (IEF) y la segunda en su separación por peso molecular (SDS-PAGE).

² DTT, ditioneitol

³ CHAPS, 3[(propil cloramida) dimetil amonio]-1-propanosulfonato

PRIMERA DIMENSIÓN (IEF). La separación por punto isoeléctrico (IEF) se realizó en tubos capilares de 1 mm de diámetro. Los geles IEF se prepararon con urea 9.2 M (Sigma), 2.5% de CHAPS (Bio Rad), 4% de acrilamida-Bis (Bio Rad), 5% de amfolitos de rango 5/7 (Bio Rad) y 2% de amfolitos de rango 3/10 (Bio Rad), persulfato de amonio al 0.01% (Bio Rad) y TEMED al 0.1 % (Bio Rad). Los geles se dejaron polimerizar durante 2 horas y se colocaron en la cámara de electroforesis con los tubos conectores. Cada capilar contenía 10 µg de proteína del control o del tratamiento y 15 µl del amortiguador de carga [urea 9 M (Sigma), 0.8% de amfolitos de 5/7 (Bio-Rad) y 0.2 % de amfolitos de 3/10 (Bio-Rad)]. A la cámara superior (cátodo) se le agregó una solución de NaOH 100 mM (J.T. Baker) y a la cámara inferior (ánodo) una solución de H₃PO₄ 10 mM (J.T Baker). La electroforesis se llevó a cabo primero a 500 volts por 10 minutos y después a 750 volts por 3.5 horas. Al finalizar, los geles se sacaron de los capilares con la ayuda de una jeringa, se congelaron inmediatamente sobre hielo seco y se guardaron a -70 °C.

SEGUNDA DIMENSIÓN (SDS-PAGE). Para la separación de las proteínas por peso molecular se utilizó un gel resolvidor de 12 % de acrilamida y SDS, y un gel concentrador de 4% de acrilamida. Los geles IEF se equilibraron con un amortiguador de carga [Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.8, 2.3 % de SDS (w/v), 10% de glicerol (w/v), 0.05% de azul de bromofenol (w/v) y 5% de β-mercaptoetanol (v/v)] durante 10 minutos. Los geles ya equilibrados se colocaron sobre el gel resolvidor y en un pozo los marcadores de peso molecular como referencia (BioRad). El amortiguador de corrimiento contenía: Trizma 25 mM, glicina 0.192 mM y 1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo a 50 volts por 15 minutos y posteriormente a 100 volts por 2 horas. Al finalizar, los geles se fijaron en una solución de metanol al 50 % y ácido acético al 10% y posteriormente se tiñeron con nitrato de plata.

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA. Los geles fijados se lavaron con agua destilada por 15 minutos en agitación constante; se pasaron a una solución al 50 % de metanol por 30 minutos y después a una solución al 0.02% de formaldehído (37 %, Sigma) por 20

minutos. Los geles se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución al 0.8 % de nitrato de plata, hidróxido de sodio 1.3 mM e hidróxido de amonio al 1% por 20 minutos. Por último, los geles se enjuagaron varias veces con agua destilada y las bandas de proteína se revelaron con una solución al 0.05% de citrato monohidratado y formaldehído al 0.02%. Una vez que las bandas aparecen, la tinción se detiene por medio de una solución de metanol al 50% con 10 % de ácido acético. Los geles se secaron o se guardaron en una solución al 10 % de glicerol para su posterior análisis (Oakley et al., 1980).

ANÁLISIS DE LOS GELES: Con el fin de determinar los cambios más importantes en el patrón de proteínas de las raíces de las plantas tratadas con respecto a su control, los geles fueron analizados por densitometría de láser con el programa Gel-Scan XL, versión 2.1 (1989). Este programa asigna un valor de absorbencia a cada punto (proteína) el cual depende del tamaño e intensidad del mismo. A éstos valores de absorbencia se les resta el valor de fondo de cada imagen. El efecto del tratamiento sobre el patrón de proteínas se obtuvo al comparar los valores de absorbencia promedio de las proteínas del control con respecto a los valores del tratamiento. Este efecto se determinó como un aumento, disminución o desaparición, cuando la absorbencia de las proteínas del tratamiento aumentaba, disminuía o no se detectaba. Proteínas nuevas se reportaron cuando aparecieron en los geles del tratamiento y no estaban presentes en los del control. Los pesos moleculares relativos de las proteínas 'afectadas' fueron calculados con el logaritmo de los pesos moleculares de los marcadores en función de la migración de las proteínas de interés.

MICROSECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó la micro-secuenciación de la región amino terminal de dos proteínas cuya síntesis fue significativamente afectada. Para la preparación de la muestra de

proteínas se siguió la metodología descrita por Barent y Elthon (1992) y por Dunbar et al., (1997).

PRIMERA DIMENSIÓN (IEF). Para cada gel se utilizaron 400 µg de proteína disuelta en la solución de monómeros, la cual contenía: 0.2% de urea (Sigma), 4.5% de acrilamida-bis (Bio-Rad), 5% de amfolitos 5/7 (Bio-Rad), 2% de amfolitos 3/10 (BIO-RAD), tioglicolato de sodio 0.11 mM (Sigma) y Glutación 0.05 mM (Sigma). Esta solución de monómeros se mezcló perfectamente y con una pipeta se llenó cada tubo capilar; el tubo capilar se colocó horizontalmente y se dejó solidificar durante media hora. La electroforesis se corrió a 500 volts por 10 minutos y 750 volts por 3 hrs. Al finalizar la electroforesis los geles se sacaron de los capilares con la ayuda de una jeringa, se congelaron inmediatamente sobre hielo seco y se guardaron a -70 °C, hasta que se utilizaron para la segunda dimensión .

SEGUNDA DIMENSIÓN (SDS-PAGE). El gel resolvidor se realizó con acrilamida al 12% y el gel concentrador con acrilamida al 4%. Los geles IEF se equilibraron siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente; la única diferencia es que al correr la electroforesis (75 volts por 3 hrs), el amortiguador de corrimiento contenía trizma 25 mM, glicina 0.192 mM, 1% de SDS, glutación 0.05 mM (SIGMA) y tioglicolato de sodio 0.1 mM (SIGMA).

TRANSFERENCIA A LA MEMBRANA DE PVDF³. Los geles de 2D-PAGE se colocaron en un amortiguador de transferencia (trizma 48 mM, glicina 39 mM, 20% de metanol-HPLC y SDS 1.3 mM) por unos minutos. La transferencia se realizó en una cámara Hoeffer TE (semiseca) en la que se colocó primero un papel filtro (7.5 × 10 cm Bio-Rad) impregnado con el amortiguador de transferencia, el gel, la membrana de PVDF y por último otro papel filtro. La transferencia se realizó por tres horas a 70 mA° por cada gel.

³ PVDF, membrana de difloruro de polivinil lideno

TINCIÓN DE LA MEMBRANA DE PVDF: Después de la transferencia, las membranas se lavaron primero con agua destilada por unos segundos y luego con metanol. Posteriormente, las membranas se tñieron durante un minuto con una solución al 0.1% de azul de Coomassie G250 (Bio-Rad) y se destñieron con una solución de metanol al 50%, se dejaron secar sobre un papel filtro y se guardaron a -20 °C. Las proteínas de interés se cortaron y se mandaron a secuenciar al servicio de secuenciación de la Universidad de Texas, en Galveston, USA.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA EN GELES NATIVOS Y POR ESPECTROFOTOMETRÍA

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA VISUALIZAR LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA EN GEL NATIVO: La extracción de las proteínas de las raíces de las plantas cultivadas expuestas al lixiviado acuoso de *Callicarpa* y del control se realizó bajo condiciones nativas. Las raíces fueron homogenizadas con un amortiguador de K-PO₄ 50 mM, pH 7.2 y DTT 5mM (Bio-Rad). Este homogeneizado se centrifugó a 14,000 g por 15 minutos a 4°C para remover los restos celulares. La cantidad de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976).

PREPARACIÓN Y TINCIÓN DEL GEL NATIVO: El gel se preparó según el método de Laemmli (1970), sin β-mercaptoetanol, sin SDS y sin hervir las muestras. 25 µg de proteína de cada tratamiento se separaron en un gel que contenía 6.5% de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 40 Volts por 5 hrs.

Para visualizar las bandas de actividad de la catalasa se siguió el método descrito por Harris y Hopkinson (1976) modificado por Chary y Natving en 1989. Al finalizar la electroforesis los geles se sumergieron 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 (Mallinckrodt 30%) como sustrato, por 15 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 ferrocianuro de potasio (Baker) y al 2% de cloruro férrico (Baker).

Durante esta reacción, donde hay peróxido de hidrógeno y en la presencia de cloruro férrico, el ferrocianuro de potasio éste se oxida formando un precipitado azul; en cambio, en las regiones del gel donde hubo actividad de catalasa, y por lo tanto no hay peróxido de hidrógeno, este precipitado no se forma, observándose zonas claras en el gel. En el momento de observar las bandas de actividad se detiene 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_2PO_4 100 mM y EDTA 0.1 mM, y un pH 7.8. Las muestras se centrifugaron a 3,000 g por 5 min. a 4°C para remover restos celulares. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 14,000 g durante 10 min a 4°C y después se pasó a través de una columna de Sephadex G25 (Sigma); el filtrado se colectó centrifugando a 1,500 g por 5 min. 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 por espectrofotometría utilizando el método descrito por Beers y Sizer (1952). La actividad de la catalasa se midió a 240 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (UV-160A), con peróxido de hidrógeno como sustrato y 50 µg de proteína, en un volumen total de 1 ml. Los componentes de cada reacción y los volúmenes correspondientes se muestran en la siguiente Tabla:

COMPONENTES DE LA REACCIÓN	VOLUMEN PARA CADA TUBO DE REACCIÓN		
	BLANCO	CONTROL H_2O_2	MUESTRA
(50 mM KPO_4 pH 7.0)	700 µl	700 µl	750 µl
H_2O destilada	300 µl	100 µl	----
H_2O_2 (50 mM)	----	200 µl *	200 µl * (10 mM)
Extracto	----	----	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 1ml.

El decremento de la concentración de peróxido de las muestras del control y del tratamiento se monitoreó o se siguió por la disminución de la absorbencia 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 con tres experimentos por separado. La cantidad de sustrato consumido (moles de H₂O₂) por la cantidad de proteína contenida (mg) por el tiempo, se calculó con la siguiente fórmula:

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

donde:

m= pendiente

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

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

60= factor de conversión de tiempo (minutos)

prot (mg) = proteína en miligramos

MEDICIÓN DE RADICALES LIBRES Y LIPOPEROXIDACIÓN

MÉTODO POR QUIMIOLUMINISCENCIA. Para determinar si el estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *Callicarpa* producía radicales libres en las raíces de las plantas cultivadas de prueba, éstos fueron determinados por medio de la técnica de quimioluminiscencia por luminol⁴ con un contador de centelleo. El luminol es oxidado por los radicales superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hidroxilo (HO•) y el oxígeno en singulete (¹O₂), a un anión aninofalato electrónicamente excitado, que cuando baja a su estado basal, emite fotones, lo que hace posible medirlos en el contador de centelleo (Cadenas y Helmut, 1984).

La mezcla de la reacción contenía 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

⁴ Luminol , 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona.

durante 10 min. en la oscuridad. Después de este tiempo se leyeron los registros en el contador de centelleo con el programa para quimioluminiscencia. Éstos se tomaron como los registros o lecturas iniciales. Después a cada vial se le añadió 60 mg de proteína del control o del tratamiento; se volvieron a leer y se tomó como lectura final el conteo mayor. La cantidad de radicales producidos se determinó con la siguiente fórmula.

$$\text{cantidad de radicales} = \frac{\text{cpm lectura final} - \text{cpm lectura del blanco}}{0.060 \text{ mg}}$$

cpm = cuentas por minuto

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

LIPOPEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA. Para determinar si el lixiviado acuoso de *Callicarpa* ocasiona una lipoperoxidación en la membrana, se realizó la técnica de detección de dienos conjugados descrita por Recknagel y Glende (1984). Las muestras de proteínas, tanto de las raíces del control como del tratamiento, se obtuvieron de la forma descrita anteriormente. 1 mg de proteína fue disuelta 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 min. Se centrifugó a 7000 g por 5 min para separar las fases: cloroformo, proteína, metanol. La fase inferior del cloroformo se obtuvo con 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 absorbencia a 233 nm, utilizando ciclohexano puro para calibrar el espectrofotómetro.

RESULTADOS

EFFECTO DEL LIXIVIADO ACUOSO DE *CALLICARPA ACUMINATA* SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR Y SOBRE EL PATRÓN DE PROTEÍNAS DE *ZEA MAYS*, *LYCOPERSICON ESCULENTUM* Y *PHASEOLUS VULGARIS*.

Los resultados obtenidos en los bioensayos para evaluar el efecto del lixiviado acuoso de las hojas secas de *Callicarpa* sobre el crecimiento radicular de las especies de prueba, se muestran en la figura 1. El lixiviado inhibió significativamente el crecimiento radicular del jitomate (46.8%), pero no afectó el del frijol ni el del maíz.

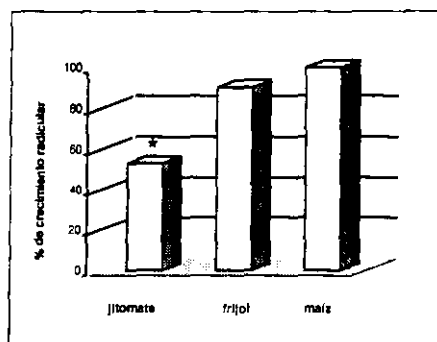
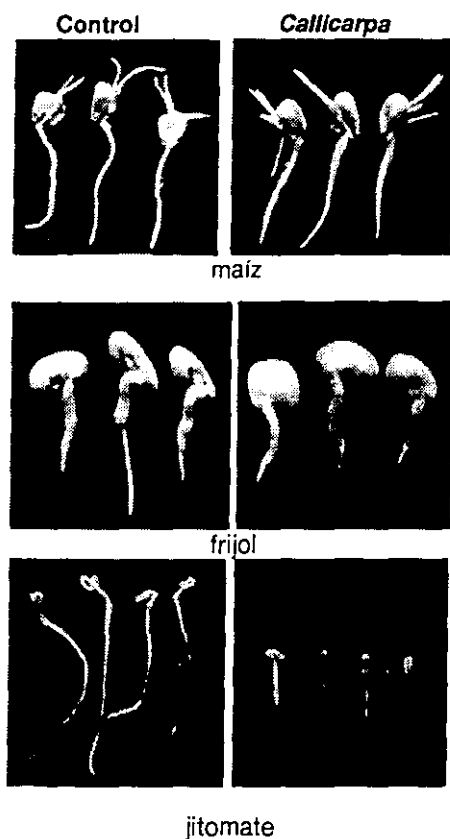


Figura 1. Efecto del lixiviado acuoso (1%) de las hojas secas de *Callicarpa* sobre el crecimiento radicular del jitomate, frijol y maíz (* $p < 0.05$). El promedio de crecimiento de las raíces del control fue considerado como el 100%.

Aunque el lixiviado de *Callicarpa* no inhibió el crecimiento radicular del frijol, si modificó su patrón de proteínas, como se observa en la Figura 2. La Tabla 1 muestra las absorbencias máximas de las proteínas de raíces de frijol del control y de las del tratamiento de *Callicarpa*; al comparar ambas absorbencias se obtuvieron los cambios provocados por los compuestos aleloquímicos de *Callicarpa* en el patrón de proteínas. Trece proteínas fueron modificadas, 4 aumentaron y 9 disminuyeron. Las proteínas 2, 4, 7 y 9 aumentaron su absorbencia más del 100 % con respecto al control y son de peso molecular bajo (8-18 kD). Las proteínas 1, 3, 5, 6, 8, 10-13 disminuyeron su absorbencia con respecto al control y tienen un peso molecular variable (10-53 kD).

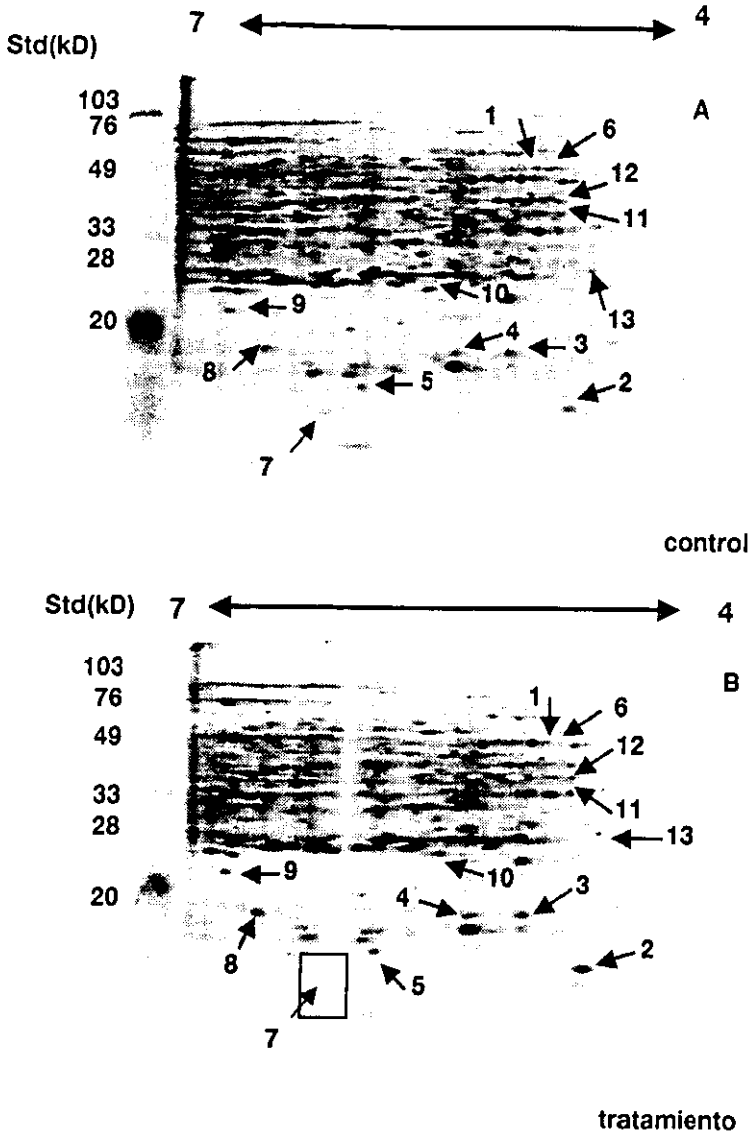


Figura 2. 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de frijol. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Callicarpa* (B). 10 μ g de proteínas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y con números que corresponden a los indicados en la Tabla 1. El cuadro en (B) señala la proteína que fue secuenciada.

Tabla 1. Absorbencias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas extraídas de las raíces de frijol del control y del tratamiento con el lixiviado acuoso de *Callicarpa*.

No. de proteína	Absorbencia máxima de proteínas		Peso molecular (kD)
	control	tratamiento	
1	0.21	0.14 (D)*	53.58
2	0.06	0.27 (A)*	8.51
3	0.14	0.05 (D)*	13.54
4	0.13	0.24 (A)*	13.54
5	0.10	0.01 (D)*	10.50
6	0.27	0.09 (D)*	52.00
7**	0.06	0.12 (A)*	11.30
8	0.04	0.02 (D)*	13.54
9	0.16	0.22 (A)	18.49
10	0.15	0.02 (D)*	22.23
11	0.15	0.09 (D)*	40.83
12	0.33	0.09 (D)*	43.85
13	0.18	0.14 (D)*	25.23

*Proteínas que aumentaron (A) y disminuyeron (D) su absorbencia más del 100 % con respecto al control. ** proteína micro secuenciada

La proteína 7 (Tabla 1) fue secuenciada pues su absorbencia aumentó significativamente en las raíces del frijol expuestas al lixiviado acuoso de *Callicarpa*, esta proteína se encontró separada de otras y esto facilitó la obtención de la misma. Dado que el amino terminal de esta proteína estaba bloqueado, se realizó una proteólisis con tripsina, y de uno de los fragmentos de esta proteólisis se leyeron 19 aminoácidos, los cuales al compararlos en el banco de proteínas (BLAST, NCBI) mostraron un 94% de identidad con el inhibidor de α -amilasa de *Phaseolus vulgaris* (Kasahara et al., 1996) (Figura 3)

proteína 7	1	ATETSSENTDGENKTNLILQ	19
(1) inhibidor de la α -amilasa	1	ATETSSENTDGENKTNLILQ	19
(2) similar al inhibidor α -amilasa	21	ATETSSENTDAFNKTNLILQ	39
(3) precursor del inhibidor de la α -amilasa	21	ATETSSENTDAFNKTNLILQ	39

Figura 3. Alineamiento de los 19 residuos de aminoácidos de la proteína 7 con secuencias del inhibidor de la α -amilasa del frijol. Números de referencia en el banco de proteínas: (1) JC4855, (Kasahara et al., 1996); (2) BAA86927 (Ishimoto et al., 1999); (3) S51830 (Mirkov et al., 1994).

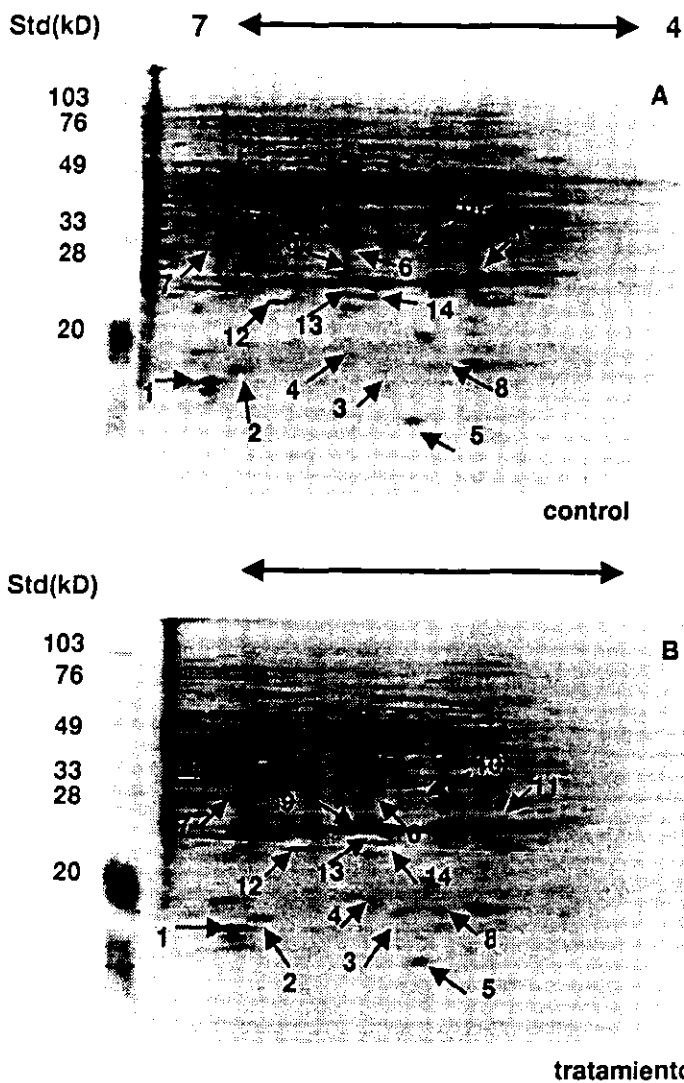


Figura 4. 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de maíz. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Callicarpa* (B). Diez μg de proteínas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y con números que corresponden a los indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Absorbencias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas extraídas de las raíces de maíz del control y de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Callicarpa*.

No. de proteína	Absorbencia máxima de proteínas		Peso molecular (kD)
	control	tratamiento	
1	0.19	0.38 (A)*	12.97
2	0.28	0.53 (A)*	13.40
3	0.06	0.12 (A)*	13.90
4	0.06	0.13 (A)*	15.01
5	0.16	0.29 (A)*	7.94
6	0.34	0.16 (D)*	26.85
7	0.54	0.35 (D)*	32.00
8	0.02	0.13 (A)*	12.65
9	0.23	0.42 (A)*	31.33
10	0.06	0.20 (A)*	32.66
11	0.62	0.84 (A)*	26.55
12	0.65	0.87 (A)*	21.67
13	0.14	0.17 (A)*	22.86
14	0.22	0.33 (A)*	22.86

(A) Aumentó, (D) Disminuyó. * Efecto del 100 % con respecto al control

El lixiviado acuoso de *Callicarpa* no afectó el crecimiento radicular del maíz (Figura 1), sin embargo, alteró su patrón de proteínas (Figura 4 y Tabla 2). La absorbencia de 14 proteínas fue significativamente modificada, de ellas 12 aumentaron y 2 disminuyeron. Las proteínas que aumentaron tienen un peso molecular entre 7 y 15 kD (1-5 y 8) y entre 21 y 31 kD (9-14). Las dos proteínas que disminuyeron (6 y 7) tienen un peso de 26.9 y 32 kD respectivamente. Las proteínas cuya absorbencia aumentó, probablemente representan uno de los mecanismos de tolerancia o resistencia del maíz al estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *Callicarpa*. Se ha observado un aumento similar en la síntesis de varias proteínas de especies de plantas diversas como respuesta a diferentes factores de estrés ambiental. Por ejemplo, *Mesembryantum crystalinum*, durante un estrés hídrico o salino, aumenta la cantidad de sus enzimas involucradas en la síntesis de osmolitos u osmoprotectores (Vernon et al., 1992), y de la isoenzima de la PEPcarboxilasa, por lo cual el tipo de fotosíntesis que lleva a cabo, cambia de C3 a CAM (Forsthoefel et al., 1995; Cushman et al., 1999).

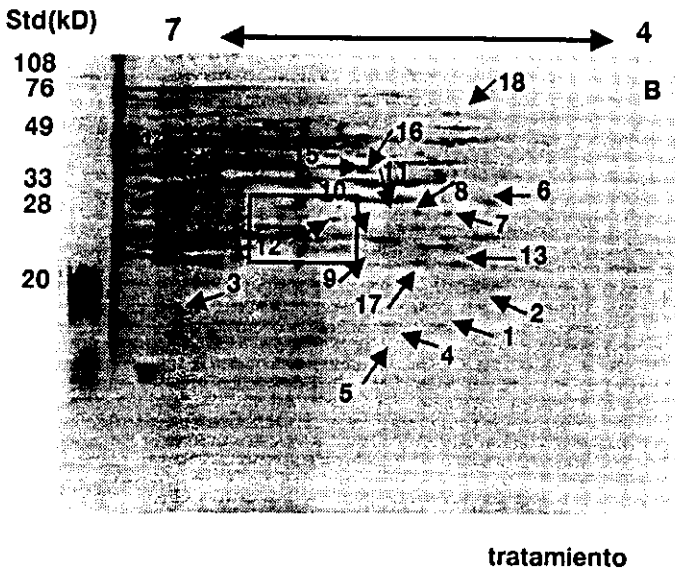
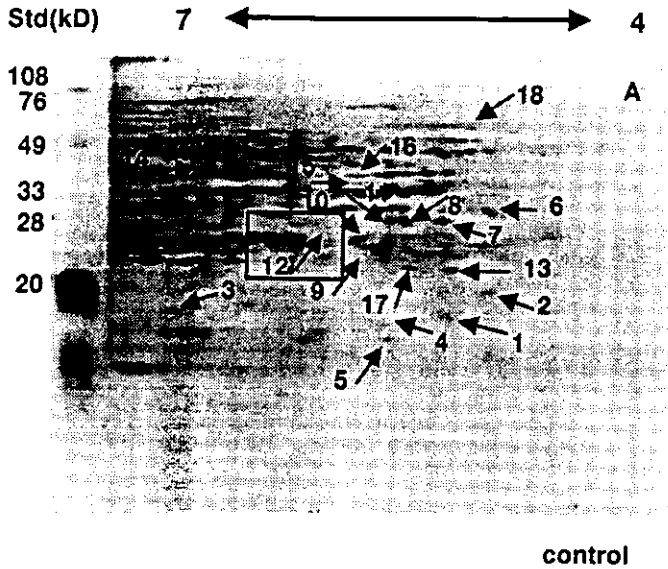


Figura 5. 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de jitomate. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Callicarpa* (B). 10 μ g de proteínas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y con números que corresponden a los indicados en la Tabla 3. El cuadro en (B) señala la proteína 12, que no aparece en el control y la cual fue secuenciada.

Tabla 3. Absorbencias máximas y pesos moleculares relativos en (kD) de las proteínas extraídas de las raíces de jitomate del control y de las tratadas con el lixiviado de *Callicarpa*.

No. de proteína	Absorbencia máxima de proteínas		Peso molecular (kD)
	control	tratamiento	
1	0.26	0.06 (D)*	17.02
2	0.26	0.02 (D)*	14.45
3	0.14	0.21 (A)*	15.24
4	0.10	0.03 (D)*	13.56
5	0.14	0.04 (D)*	12.16
6	0.13	0.07 (D)*	27.54
7	0.26	0.12 (D)*	29.24
8	0.30	0.12 (D)*	30.20
9	0.13	0.03 (D)*	20.99
10	0.12	0.02 (D)*	25.70
11	0.16	0.03 (D)*	28.97
12**	0.02	0.21 (N)*	27.54
13	0.47	0.22 (D)*	20.89
14	0.10	0.33 (A)*	42.66
15	0.06	0.27 (A)*	40.74
16	0.34	0.36 (A)*	42.67
17	0.29	0.16 (D)*	20.89
18	0.26	0.10 (D)*	62.23

(A) Aumentó, (D) Disminuyó, (N) Nueva, (*) Efecto de 100% con respecto al control
 ** proteína secuenciada

El lixiviado acuoso de *Callicarpa* inhibió significativamente el crecimiento radicular del jitomate (46.7%) (Figura 1) y también afectó su patrón de proteínas citoplásmicas (Figura 5 y Tabla 3). Al comparar las absorbencias del patrón de proteínas del control con el del tratamiento, encontramos que 18 proteínas fueron modificadas significativamente en las raíces tratadas con *Callicarpa*. Trece proteínas disminuyeron su absorbencia, 4 la aumentaron y una nueva apareció. Las proteínas que aumentaron fueron la 3, 14, 15 y 16, con pesos moleculares de 15.2, 42.6 y 40.7 kD respectivamente; todas las que disminuyeron son de pesos moleculares variables, desde 14 hasta 60 kD. La inhibición del crecimiento radicular por el estrés aleloquímico, observada en el jitomate, puede estar relacionada con el hecho de que 13 proteínas hayan disminuido su absorbencia. La micro

secuenciación de la terminal amino de la proteína 12, que apareció como nueva en el tratamiento, mostró una secuencia de 23 aminoácidos que fueron comparados en el banco de proteínas (BLAST, NCBI). La comparación mostró que fueron similares un 90-95% a las enzimas glutatión-S-transferasa (EC 2.5.1.18) (GST) de varias plantas (Figura 6).

proteína # 12	1	AIK... HEPDMSPSAMRIV ... IVLREK D	23
(1) GST <i>Solanum commersonii</i>	2	AIK... HLSDMSPSAMRV ... VATLREK D	25
(2) GST <i>Hyoscyamus muticus</i>	3	-MIL... HPDMSPSAMRV ... IATLREK D	25
(3) GST <i>Arabidopsis thaliana</i>	3	SIK... HLVDMSAMRRL ... LATLREK D	26

Figura 6. Alineamiento de los 23 aminoácidos de la proteína 12. Los residuos en negritas son aquellos idénticos en las cuatro proteínas. Números de accesión: (1) TO7906 (Seppanen, sin publicar); (2) P46423 (Bilang et al., 1993); (3) CAA64613 (Chen et al., sin publicar).

Las proteínas glutatión-S-transferasas (GST) son enzimas que catalizan la conjugación del tripéptido glutatión (GSH) a una gran variedad de sustratos hidrofóbicos, electrofílicos y comúnmente fitotóxicos. En las plantas, se ha observado que las GST intervienen en la detoxificación de los herbicidas y también están implicadas en numerosas respuestas a factores de estrés como el ataque por patógenos, la toxicidad por metales y el estrés oxidativo (Marrs, 1996).

Por otra parte, el estrés oxidativo, causado por la acumulación de radicales libres, se puede generar como un estrés secundario causado por varios factores incluyendo a la sequía, las temperaturas extremas y la anaerobiosis, entre otros (ver Introducción). Como ya se mencionó, la formación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres puede producir un efecto perjudicial en las membranas de las células, dañando procesos como fotosíntesis, respiración, crecimiento, o bien aumentando la susceptibilidad de las plantas a otros factores de estrés (Scandalios, 1997). Para minimizar los daños producidos por los radicales libres, los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos enzimáticos para remover o detoxificar a las células, entre ellos se encuentra la síntesis de catalasa, SOD dismutasa, peroxidasas y otras enzimas como la GST.

Tabla. 4. Resumen del número de proteínas citoplasmáticas modificadas por el estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *Callicarpa acuminata* en las raíces de maíz, frijol y jitomate.

Plantas cultivadas	Número de proteínas modificadas por <i>Callicarpa acuminata</i>			
	Aumentan (A)	Disminuyen (D)	Nueva (N)	Total
Maíz	12	2	-	14
Frijol	4	9	-	13
Jitomate	4	13	1	18

En la Tabla 4 se puede observar que el jitomate fue la planta más afectada por el lixiviado de *Callicarpa*, tanto en el crecimiento radicular (Figura 1) como al nivel de síntesis de proteínas, pues presentó un total de 18 proteínas afectadas, de las cuales 13 disminuyeron y una apareció como nueva (Figura 5).

EFFECTO DEL LIXIVIADO ACUOSO DE *CALLICARPA ACUMINATA* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA, RADICALES LIBRES Y DIENOS CONJUGADOS EN LAS RAÍCES DE *ZEA MAYS*, *LYCOPERSICON ESCULENTUM* Y *PHASEOLUS VULGARIS*.

Para determinar el efecto del lixiviado acuoso de *Callicarpa* sobre la actividad de la catalasa en las raíces de frijol, maíz y jitomate, se realizaron geles nativos o zimogramas. Los resultados (Figura 7) muestran que la actividad de la catalasa aumenta tanto en las raíces de frijol como en las de jitomate, siendo mayor el aumento en el segundo. La actividad de la catalasa disminuye en la raíz del maíz. En este último, se han identificado tres isoenzimas de la catalasa, CAT1, CAT2 y CAT3, la primera y la última se expresan en la raíz, sin embargo, como resultado de nuestros experimentos, sólo se observó la actividad de una de ellas (aparentemente la CAT3) (Figura 7). Los resultados obtenidos en los zimogramas se confirmaron por espectrofotometría, midiendo la actividad de la catalasa (Tabla 5); este método se basa en la medición de la desaparición del sustrato H_2O_2 y registrando el cambio de absorbencia a 240 nm durante cierto periodo de tiempo. La actividad se reporta como $\mu\text{mol } H_2O_2$ consumido por minuto por mg de proteína.

**ESTE TEXTO NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

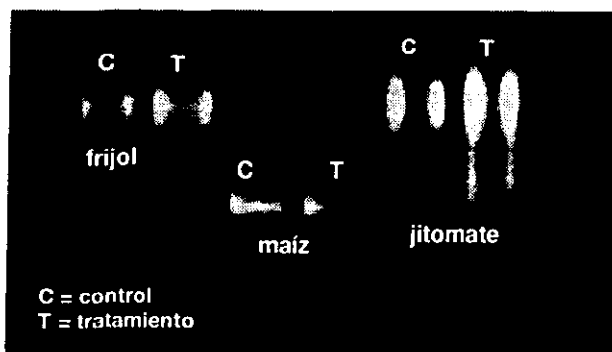


FIGURA 7. Zimograma o gel nativo de la actividad de la catalasa en raíces de frijol, maíz y jitomate tanto del control como del lixiviado acuoso (1%) de *Callicarpa*. Se utilizaron 25 μ g de proteína en cada tratamiento. El gel es representativo de tres experimentos.

Tabla 5.- Medición de la actividad de la catalasa por espectrofotometría en las raíces de maíz, frijol y jitomate tratadas con el lixiviado acuoso (1%) de la parte aérea seca de *Callicarpa*. Los datos son el promedio de tres repeticiones de tres experimentos por separado.

ESPECIE	ACTIVIDAD DE LA CATALASA (μ MOL MG ⁻¹ MIN ⁻¹)	
	CONTROL	TRATAMIENTO
Maíz	3.2 E ⁻³ \pm 1.65	1.4 E ⁻³ \pm 0.39
Frijol	1.7 E ⁻³ \pm 0.36	2.5 E ⁻³ \pm 0.21
Jitomate	1.9 E ⁻³ \pm 0.39	3.7 E ⁻³ \pm 1.20

La actividad de la catalasa en las raíces de maíz tratadas con *Callicarpa*, disminuyó 2.2 veces con respecto al control; en frijol aumentó 1.4 veces y en jitomate aumentó 2 veces (Tabla 5). Estos resultados concuerdan con los observados en el gel nativo (Figura 7). Otro parámetro que se midió fue el efecto sobre la producción de los radicales libres del lixiviado de *Callicarpa*; los radicales libres se midieron utilizando el luminol (5-amino-2,3 dihidroftalazina). Los resultados muestran que en frijol y en jitomate los radicales libres aumentaron significativamente, 3.8 y 2.1 veces respectivamente, con respecto a sus controles (Tabla 6), y en el maíz se observó una inhibición (aunque no fue significativa).

Tabla 6.-Medición de los radicales libres y dienos conjugados en las raíces de maíz, frijol y jitomate tratadas con el lixiviado acuoso (1%) de la parte aérea de *Callicarpa*.

ESPECIE	RADICALES LIBRES (cpm/mg)		LIPOPEROXIDACIÓN (ΔA_{233})	
	CONTROL	CALLICARPA	CONTROL	CALLICARPA
Maíz	8.13 \pm 1.7	6.17 \pm 1.1	0.364 \pm 0.05	0.394 \pm 0.05
Frijol	2.16 \pm 0.5	8.16 \pm 1.0	0.250 \pm 0.07	0.241 \pm 0.02
jitomate	4.16 \pm 1.2	8.6 \pm 3.11	0.199 \pm 0.03	0.476 \pm 0.00

cpm/mg = conteos $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.
 (ΔA_{233}) cambio en absorbencia a 233 nm

La producción de radicales libres se puede correlacionar con la tasa de lipoperoxidación detectada por los dienos conjugados (Tabla 6). En el maíz y en el frijol no se detectó ningún efecto, sin embargo en el jitomate hubo un aumento significativo de 2.4 veces más lipoperoxidación en las raíces tratadas con *Callicarpa*. Los resultados observados en el maíz y en el frijol sugieren que su sistema de remoción de radicales libres, y por lo tanto el control del daño producido por ellos, está funcionando mejor que en el jitomate, donde observamos un aumento tanto en la producción de radicales libres como en la lipoperoxidación.

DISCUSIÓN

En este trabajo se describen los efectos del estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) sobre el crecimiento radicular, el patrón de proteínas citoplásmicas, la actividad de la catalasa, la formación de radicales libres y la lipoperoxidación en las raíces de frijol, maíz y jitomate.

El lixiviado de *Callicarpa* inhibió 46.8 % el crecimiento radicular del jitomate (Figura 1), pero no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento radicular del frijol y del maíz. En otros estudios (Hernández et al., 1996; Anaya y del Amo, 1999; y Romero, 2000) se ha observado que los lixiviados acuosos de otras plantas con potencial alelopático como *Sicyos*, *Acacia*, *Lantana* y *Sebastiania*, inhibieron más del 50% el crecimiento radicular del jitomate; las tres primeras también inhibieron significativamente al frijol, pero no tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular del maíz. De todos estos resultados se observa que el jitomate es la especie de prueba más sensible al estrés aleloquímico y que el maíz es la más resistente

El hecho de que el lixiviado acuoso de *Callicarpa* no tenga un efecto aparente sobre el crecimiento de una planta, no significa que los metabolitos secundarios presentes en él, no estén afectando el metabolismo de la misma.

Los mecanismos de acción de los aleloquímicos, pueden ser estudiados por medio del análisis de procesos fisiológicos por separado, o bien analizando los cambios causados sobre el patrón de proteínas del organismo receptor. En el presente trabajo se identificaron y compararon las alteraciones en el patrón de proteínas citoplásmicas causadas por el estrés aleloquímico de *Callicarpa*, utilizando la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE). Al realizar el análisis de los geles por densitometría y comparar los patrones proteicos de las raíces del tratamiento con su control, se pudieron determinar aquellas proteínas que aumentaban, disminuían, desaparecían, o bien, aparecían con el tratamiento.

En el caso del frijol, aunque el crecimiento radicular no fue afectado por el lixiviado de *Callicarpa*, el patrón de proteínas fue significativamente modificado (Figura 2, Tabla 1). De las trece proteínas modificadas, nueve disminuyeron y solo

cuatro aumentaron su absorbencia. Estas modificaciones sugieren que durante el estrés aleloquímico causado por *Callicarpa*, se producen cambios o ajustes bioquímicos en el metabolismo del frijol, como una respuesta ante una condición adversa, con el fin de hacerle frente y poder resistir. Las proteínas que disminuyeron pueden representar alteraciones o daños a los procesos metabólicos, aunque éstos no se manifiesten como inhibición del crecimiento radicular. Esta misma respuesta se ha observado frente a otros tipos de estrés como el aumento de temperatura, durante el cual la síntesis normal de proteínas disminuye y se inducen proteínas nuevas (proteínas de choque térmico o heat shock -HSP) (Vierling, 1991, Waters, 1995). En el caso de las cuatro proteínas que aumentaron en las raíces de frijol, tal vez nos encontramos frente a un mecanismo de defensa en el cual estos cambios pueden significar el mantenimiento de una tasa metabólica normal.

Como se mencionó, la secuencia parcial de aminoácidos de una de las proteínas que aumentaron su absorbencia (proteína 7, figura 2, tabla 1), con un peso molecular de 11.30 kD, fue similar un 94% con la subunidad alfa del inhibidor de la α -amilasa de *Phaseolus vulgaris* (Figura 3). Esta enzima inhibe la α -amilasa de insectos y animales y tiene un papel importante en la defensa de las semillas ricas en almidón que son atacadas por larvas de insectos (Kasahara, 1996). Al igual que muchas otras proteínas de defensa, el inhibidor de α -amilasa podría aumentar su síntesis por efecto del estrés aleloquímico, como un mecanismo de defensa general que se induce durante períodos adversos, en los cuales la planta es más susceptible a otros factores negativos del medio, ya sea bióticos o abióticos. Se ha reportado que diferentes factores de estrés pueden inducir la síntesis de una proteína particular de estrés, aunque no se trate del factor estresante por el cuál se identificó a esta proteína. Por ejemplo, una proteína relacionada con la patogénesis (PR2) puede ser inducida por el aluminio en las raíces de trigo, cuyo crecimiento es severamente inhibido por este metal (Cruz-Ortega y Ownby, 1993).

Por otro lado, la actividad de la catalasa en las raíces de frijol expuestas al lixiviado acuoso de *Callicarpa*, fue 1.4 veces mayor que la de las raíces del control

(Tabla 4). Así mismo, se observó un aumento en el número de radicales libres, pero no hubo lipoperoxidación (Tabla 5). Estos resultados sugieren que los sistemas de defensa del frijol le ayudan, hasta cierto grado, a hacer frente al estrés aleloquímico de *Callicarpa* (Figura 1).

En el caso del maíz, se observó que el lixiviado acuoso de *Callicarpa* no tuvo efecto sobre el crecimiento radicular, sin embargo, al igual que en el caso del frijol, modificó significativamente su patrón de proteínas. El efecto sobre las proteínas del maíz fue contrario al observado en el frijol, 12 de las 14 proteínas modificadas en el maíz aumentaron su absorbencia y únicamente dos la disminuyeron. El aumento en la síntesis de proteínas bajo condiciones de estrés podría significar un ajuste metabólico que el maíz realiza para contrarrestar los efectos del estrés. En un trabajo previo (Romero-Romero, 2000) el maíz mostró ser la planta cultivada de prueba con mayor tolerancia al estrés aleloquímico. Riccardi y colaboradores (1998) observaron que en hojas de maíz, el estrés hídrico induce cambios en el patrón de proteínas, y que las secuencias de algunas de ellas correspondían a enzimas de la glucólisis y del ciclo de Krebs, como la triosa-fosfoisomerasa, la enolasa, y la NAD-malato deshidrogenasa, elementos de las vías metabólicas básicas para la sobrevivencia de la planta. Por otro lado, el lixiviado de *Callicarpa* disminuyó la actividad de la catalasa en el maíz (Tabla 4), pero no causó un aumento en los radicales libres ni se observó lipoperoxidación (Tabla 5), lo que sugiere que el maíz puede tener otro tipo de mecanismos de defensa o tolerancia que le ayuden a sobrevivir bajo condiciones de un estrés aleloquímico.

De las tres plantas cultivadas de prueba utilizadas en el presente trabajo, el jitomate fue la especie cuyo crecimiento radicular y patrón de proteínas citoplásmicas fueron significativamente afectados por el lixiviado de *Callicarpa*. De las 18 proteínas modificadas en el jitomate, 13 disminuyeron por el tratamiento, 4 aumentaron y una apareció como nueva (Figura 5, Tabla 3). En este caso, la inhibición del crecimiento radicular está relacionada con la disminución de la síntesis de proteínas, lo que significa un daño a los procesos metabólicos. La secuencia de la proteína inducida por el tratamiento (Figura 5) fue similar en un 95% con la de la enzima glutation-S-transferasa de *Solanum commersoni* y otras especies de plantas (Figura 6). Las enzimas glutation S-transferasas catalizan la

conjugación del tripéptido glutatión (GSH) con una variedad de sustancias hidrofóbicas, electrofílicas y fitotóxicas, lo que habla de su importante papel en la inactivación de compuestos tóxicos. Estas enzimas han sido implicadas, además, en numerosas respuestas de las plantas a diversos factores de estrés, como las originadas por patógenos, estrés oxidativo y toxicidad por metales (Marrs, 1996). El efecto general del estrés causado por *Callicarpa* sobre el jitomate, determinó la disminución de la síntesis de ciertas proteínas y la inducción de otras, como la GST, que ayudan a la planta a enfrentar el estrés aleloquímico, aunque esto no signifique la resistencia total. En el presente trabajo, aumentó la producción de radicales libres y la lipoperoxidación en las raíces de jitomate tratadas con *Callicarpa*, y por lo tanto, la actividad de la catalasa, la cual aumenta al doble (Figura 5 y Tabla 4); sin embargo, esta respuesta no parece ser suficiente para detener el daño que se manifiesta como inhibición del crecimiento radicular y disminución de la síntesis de algunas proteínas. Esto coincide con lo mencionado por Prasad (1997), que bajo condiciones oxidativas prolongadas, las especies activas de oxígeno pueden causar lipoperoxidación, daño al DNA y desnaturalización de proteínas. El aumento de la actividad de la catalasa en las plantas y otros organismos es uno de los mecanismos de defensa ante un daño oxidativo generado por varios factores de estrés (Prasad 1997; Lingoiang y Scandalios, 1995). Rainwater y colaboradores (1996) reportan que en semillas de diferentes variedades de jitomate, la actividad de la catalasa también aumenta como respuesta a temperaturas altas. El estrés aleloquímico producido por *Callicarpa* sobre las tres plantas cultivadas, puede estar determinado por algunas moléculas biodinámicas hasta ahora identificadas en esta planta, como la α -amirina, el ácido isopimárico y otros terpenoides (Anaya et al., en preparación).

El presente trabajo es una aportación al conocimiento de los mecanismos de acción de compuestos aleloquímicos sobre diversos procesos vitales en las plantas. Asimismo, este campo de estudio contribuye al descubrimiento de nuevas moléculas útiles, como plaguicidas y drogas, en las plantas u otros organismos que existen en los diversos ecosistemas de nuestro país, y pone en evidencia el valor agregado, aun desconocido, de los recursos naturales de México.

CONCLUSIONES

1. El lixiviado acuoso (1%) de la parte aérea de *Callicarpa acuminata* inhibió significativamente el crecimiento radicular del jitomate (46.8%), pero no el del frijol ni el del maíz.
2. El lixiviado acuoso (1%) de la parte aérea de *Callicarpa acuminata* modificó el patrón de proteínas citoplasmáticas de las raíces de las tres plantas de prueba: maíz, frijol y jitomate. En las tres se observó que la expresión de varias proteínas de distintos pesos moleculares, aumentaba, disminuía, y en ciertos casos, algunas proteínas desaparecían y/o aparecían por efecto del lixiviado de *Callicarpa*.
3. La secuencia parcial de la proteína de 11.30 kD, cuya expresión aumentó por efecto del lixiviado de *Callicarpa* en las raíces de frijol, presentó el 94% de similitud a la subunidad alfa del inhibidor de la α -amilasa de *Phaseolus vulgaris*. Esta enzima inhibe la α -amilasa de insectos y animales y tiene un papel importante en la defensa de las semillas ricas en almidón que son atacadas por larvas de insectos.
4. La secuencia de la terminal amino de la proteína de 27.5 kD, cuya expresión aumentó en las raíces de jitomate por efecto del lixiviado de *Callicarpa*, presentó el 95% de similitud con las enzimas glutatión-S-transferasas de varias plantas. Estas enzimas tienen como función la inactivación de compuestos tóxicos.
5. El lixiviado acuoso de *Callicarpa* aumentó la actividad de la enzima catalasa en las raíces de jitomate y de frijol, pero no afectó su actividad en las raíces de maíz. La actividad de la catalasa se comprobó tanto por espectrofotometría como a través de geles nativos. La catalasa es una enzima de defensa contra los radicales libres, la cual cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno.
6. La producción de radicales libres, la cual está correlacionada con la tasa de lipoperoxidación, aumentó en las raíces de jitomate tratadas con el lixiviado acuoso de *Callicarpa*. En las raíces de jitomate el aumento de radicales libres nos muestra que hay un daño en la membrana, lo que se comprobó con el aumento de lipoperoxidación. En cambio, en las raíces de maíz y frijol, no hubo un aumento de radicales libres, lo que sugiere que su sistema de remoción de éstos, funciona adecuadamente, y por lo tanto, no hay un daño en la membrana. Esto se puso en evidencia al medir la lipoperoxidación; los resultados en las raíces tratadas demostraron que no hubo un cambio significativo.
7. El estrés aleloquímico producido por el lixiviado acuoso de *Callicarpa* afecta de manera diferencial el crecimiento radicular, el patrón de proteínas y el sistema antioxidante de las tres plantas cultivadas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anaya, A.L. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18** (6): 697-739.
- Anaya, A.L. y S del Amo. 1999. Searching for new biocides in the tropical forests in the El Eden ecological reserve, Quintana Roo, Mexico. Final Report. USDA MX-AES6, Grant: FG-Mx- 107.135 pp
- Anaya, A.L. y H.R. Pelayo-Benavides. 1997. Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae): Effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy Journal* **4** (1): 57-68.
- Aust, S.D., L.A. Morehouse y C.E. Thomas. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol. Med.* **1**: 3-25.
- Barent, L.R. y E.T. Elthon. 1992. Two-dimensional gels: an easy method for large quantities of proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **10** (4): 338-344.
- Berg, B. 1986. The influence of experimental acidification on nutrient release and decomposition rates of needle and root litter in the forest floor. *For. Ecol. Manag.* **15**: 195-213.
- Beers, F. y I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140
- Bilang, J., H. Macdonald, P.J. King y A. Sturm. 1993. A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiol.* **102** (1):29-34
- 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.
- Cadenas, E. y S. Helmut. 1984. Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods in Enzymology* **105**:221-231.
- Calera, M.R., A.L. Anaya y M. Gavilanes-Ruiz. 1995a. Effect of phytotoxic resin glucoside on the activity of H⁺-ATPase from plasma membrane. *J. Chem. Ecol.* **21**: 289-297.
- Calera, M.R., R. Mata, A.L. Anaya y B. Lotina-Hennsen. 1995b. 5-O-B-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3'4'dihydroxi-4-fenilcumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* **45**:105-110.

- Calera, M.R., R. Mata., B. Lotina-Hennsen y A.L. Anaya. 1996. Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts- structure-activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* **44** (10): 2966-2969.
- Chary, P. y D.O. Natvig. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* **171**: 2646-2652.
- Chou, C.H., T.J. Lin y C.I. Kao. 1977. Phytotoxins produced during decomposition of rice stubbles in paddy soil and their effect on leachable nitrogen. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **18**: 45-60.
- Chou, C.H. y S.J. Chiou. 1979. Autointoxication mechanism of *Oriza sativa*. Effects of culture treatments on the chemical nature of paddy soil and on rice productivity. *J. Chem. Ecol.* **5**: 839-859.
- Cooper, P y T.D. Ho. 1983. Heat shock proteins in maize. *Plant Physiol.* **71**: 215-222.
- Cruz-Ortega, R., A.L. Anaya y L. Ramos. 1988. Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watermelon. *J. Chem. Ecol.* **14**: 71-86.
- Cruz-Ortega, R. y J.D. Ownby. 1993. A protein similar to PR protein is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol. Plant.* **89**: 211-219.
- Cushman, J.C. y H.J. Bohnert. 1999. Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. *Annu. Rev. Plant. Physiol. and Plant. Mol. Biol.* **50**: 333-359.
- Del Moral, R. y C.H. Muller. 1970. The allelopathic effects of *Eucalyptus camaldulensis*. *Am. Midl. Nat.* **83**: 254-282.
- Devi, R.S., F. Pellissier y M.N.V. Prasad. 1997. Allelochemicals. M. N. V. Prasad (Ed). *Plant Ecophysiology*. Jonh Wiley and Sons. Inc. New York: 253- 304.
- Devi, R.S. y M.N.V. Prasad. 1992. Effect of ferulic acid on growth and hidrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. *J. Chem. Ecol.* **18** (11): 1981-1990.
- Downum, K.R. 1992. Light-activated plant defence. *New Phytol.* **122** (3): 401-420.
- Dunbar, B., T.E. Eithon., J.C. Osterman, B.A. Whitaker y S.B. Wilson. 1997. Identification of plant mitochondrial proteins: a procedure linking two-dimensional gel electrophoresis to protein sequencing from PVDF membranes using a fastblot cycle. *Plant Molecular Biology Reporter* **15** (1): 46-61.

- Einhellig, F.A. 1987. Interactions among allelochemicals and other stress factors of the plant environment. *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*. G. R. Waller (Ed.). American Chemical Society. Washington, D.C. **330**: 343-357.
- Einhellig, F.A. y P.C. Ecrich. 1984. Interaction of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. *J. Chem. Ecol.* **10**: 161-170.
- Einhellig, F.A., E.L. Rice, P.G. Risser y S.H. Wender. 1970. Effects of scopoletin on growth, CO_2 exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull. Torrey Bot. Club.* **97**: 22-33.
- Fischer, N.H., G.B. Williamson, J.D. Weidenhamer y D.R. Richardson. 1994. In search of allelopathy in the Florida scrub: The role of terpenoids. *J. Chem. Ecol.* **20** (6) :1355-1380.
- Forsthoefel, N.R., M.A.F. Cushman y J.C. Cushman. 1995. Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol* **108**:1185-1195.
- Galindo, J.C.G., A. Hernández, F.E. Dayan., M.R. Téllez., F.A. Macias, R.N. Paul y S.O. Duke. 1999. Dehydrozaluzanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochemistry* **52**: 805-813.
- Glass, A.D.M. 1973. Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. *Plant Physiol.* **51** (6): 1037-1041.
- Granados, D., A.D. Castañeda y O. Mendoza. 1989. *Ecología vegetal. Interacciones ecológicas de las plantas*. Universidad Autónoma de Chapingo. 85 pp
- Harris, H. y D.A. Hopkinson. 1976. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. 1-2 pp
- Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Loeliger y O.I. Aruoma. 1995. The characterization of antioxidants. *Food. Chem. Toxicol.* **33** (7): 601-617.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1989. *Free Radicals biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford. 543 p.

- Hejl, A.M., F.A. Einhellig y J.A. Rasmussen. 1993. Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. *J. Chem. Ecol.* **19**: 559-568.
- Hernández-Bautista, B.E., A. Torres-Barragán y A.L. Anaya. 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
- Holappa, L.D. y U. Blum. 1991. Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compound on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber, and bean. *J. Chem. Ecol.* **17** (5): 865-886.
- Hurkman, W. y C. Tanaka. 1988. Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: A comparison using two dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **9**: 781-787.
- International Allelopathy Society (IAS) Constitution and Bylaws. First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future Cadiz, Spain. September 1996.
- Ishii, T. y H. Saka. 1992. Inhibition of Auxin-stimulated elongation of cells in rice lamina joints by a feruloylated arabinoxylan trisaccharide. *Plant Cell Physiol.* **33** (3): 321-324.
- Ishimoto, M., T. Yamada y A. Kaga. 1999. Insecticidal activity of an alpha-amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of alpha amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Biophys. Acta.* **1432** (1):104-112.
- Kamisaka, S., S. Takeda., K. Takahashi y K. Shibata. 1990. Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles – Their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiol. Plant.* **78**: 1-7.
- Kasahara, K., K. Hayashi., T. Arakawa., J.S. Philo., J. Wen, S. Hara y H. Yamaguchi. 1996. Complete sequence, subunit structure, and complexes with pancreatic α -amylase of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. *J. Biochem.* **120**: 177-183.
- Kawazu, K., M. Inaba y T. Mitsui. 1967a. Studies on fish-killing components of *Callicarpa candicans*. Part I. Isolation of Callicarpone and its toxicity to fish. *Agr. Biol. Chem.* **31**(4): 494-497.

- Kawazu, K., M. Inaba y T. Mitsui. 1967b. Studies on fish-killing components of *Callicarpa candicans*. Part II. Structure of callicarpone. *Agr. Biol. Chem.* **31** (4): 498-506.
- Key, J.L., C.Y. Lin y Y.M. Chen. 1981. Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 3526-3530.
- 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.* Springer. Germany. 506 pp.
- Lee, T.T., A.N. Stafford, J.J. Jevnikar y A. Stoessi. 1980. New phenolic inhibitor of the peroxidase-catalysed oxidation of indoles-3-acetic acid. *Phytochemistry* **19**: 2277-2280.
- Lingoian, G. y J.G. Scandalios. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 5930-5934
- Macias, F.A., A.M. Simonet y M.D. Esteban. 1994. Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry* **36**: 1369-1379.
- Mandava, N.B. 1985. Chemistry of biology of allelopathic agents. The chemistry of allelopathy. A.C. Thompson (Ed.). American Chemical Society, Washington, DC, **268**: 33-54.
- Mason-Sedum, W., R.S. Jessop y J.V. Lovett. 1986. Differential phytotoxicity among species and cultivars of the genus *Brassica* to wheat. *Plant Soil.* **93**: 3-16.
- Marrs, K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 127-158.
- Mirkov, T.E., J.M. Wahlstrom., K. Hagiwara., F. Finardi-Filho., S. Kjemtrup y M.J. Chrispeels. 1994. Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-alpha-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant. Mol. Biol.* **26** (4): 1103-1113
- Moreland, D.F. y W.P. Novitzky. 1987. Effects of phenolic acids, coumarins, and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. G.R. Waller (Ed.). *Allelochemicals, Role in agriculture and forestry.* American Chemical Society 330, Washington, D. C. 247-261 pp.

- Muller, C.H. y E. Del Moral. 1966. Soil toxicity induced by terpenes from *Salvia leucophylla*. Bull Torrey Bot. Club. **93**: 130-137.
- Nicollier, G.F., D.F. Pope y A.C. Thompson. 1985. Phytotoxic compounds isolated and identified from weeds. A.C. Thompson (Ed). The Chemistry of allelopathy. American Chemical Society, Washington, D. C. 207- 218
- Oakley, B.R., D.R. Kirsch y N.R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **105**: 361-363.
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**: 4007-4021.
- Ownby, J.D. y W.R. Hruschka. 1991. Quantitative changes in cytoplasmic and microsomal proteins associated with aluminium toxicity in two cultivars and winter wheat. Plant Cell and Environment. **14**: 303-309.
- Patterson, D.T. 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). Weed Sci. **29**: 53-59.
- Peñuelas, J., M. Ribas-Carbo y L. Giles. 1996. Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. J. Chem. Ecol. **22** (4): 801-805.
- 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.
- Prasad, T.K. 1997. Role of catalase in Inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. Plant Physiol. **114**: 1369-1376
- Rainwater D.T., D.R. Gossett, E.P. Millhollon, H.Y. Hanna, S.W. Banks y M.C. Lucas. 1996. The relationship between yield and the antioxidant defense system in tomatoes grown under heat stress. Free Rad. Res. **25** (5): 421-235.
- Reigosa, M.J., A. Sánchez-Moreiras y L. González. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. Plant Science **18** (5): 577-608.
- Recknagel, R.O. y E.A. Glende. 1984. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. Methods in Enzymol. **105**: 331-337.
- Redinbaugh, M.G., M. Sabre y J.G. Scandalios. 1990. Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 6853-6857.

- Rice, E.L. 1984. Allelopathy. Ed. Academic Press, INC. USA. 422 pp.
- Riccardi, F., P. Gazeau, D. de Vienne y M. Zivy. 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* **117**:1253-1263.
- Ricard, B., J. Rivoal, A. Spiteri y A. Pradet. 1991. Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant. Physiol.* **95**: 669-974.
- 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 *Cucúrbita pepo* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Zea mays* L. Y *Lycopersicon esculentum* L. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM:
- Scandalios, J.G. 1997. Introduction. *Free Radical Biology and Medicine* **23** (3): 471-472.
- Subramani, S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**: 445-478.
- Sumner, J., y A. Dounce. 1937. Crystalline catalase, *J. Biol. Chem* **121**: 417-424.
- Talapatra, S.K., M. Polley y B.Talapatra.1994. Calliphyllin, a new diterpene from the leaves of *Callicarpa macrophylla*. *J. Indian Chem. Soc.* **71**:527-532.
- Tukey, H.B. Jr. 1969. Leaching of metabolites from above ground plant parts and its implications. *Bull Torrey Bot. Club.* **93**: 385.
- Vernon, D.M. y H.J. Bohnert. 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* **11**:2077-2085
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **42**: 579-620.
- Waters, E.R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics.* **141**: 785-795.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.* **74**: 1
- Yu, J.K. y Y. Matsui. 1994. Phytotoxic substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Chem. Ecol.* **20**: 21-31.
- Ziegler, H. 1990. Roles of plant physiology assessing productivity potential under stress environment. *Proceeding of the international Congress of Plant Physiology'88.* New Delhi. India. 10-17.