



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN AGROQUÍMICA DE COMPUESTOS DE ORIGEN
PROTEICO CON EFECTO HERBICIDA EXTRAÍDOS DE SEMILLA DE AMARANTO.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CRISTIAN FABIÁN SALINAS MANZO

TUTOR:

DR. MANUEL SORIANO GARCÍA

INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN AGROQUÍMICA DE COMPUESTOS DE ORIGEN
PROTEICO CON EFECTO HERBICIDA EXTRAÍDOS DE SEMILLA DE AMARANTO.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CRISTIAN FABIÁN SALINAS MANZO



TUTOR: DR. MANUEL SORIANO GARCÍA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2016

JURADO

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Arturo Navarro Ocaña
Vocal	Dr. Jesús Méndez Lozano
Secretario	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio BQ-2, Departamento de Química de Biomacromoléculas.

Instituto de Química, Ciudad Universitaria.

Universidad Nacional Autónoma De México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y al Instituto de Química por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (número de becario: 336001).

Al Dr. Manuel Soriano García por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección.

A los miembros del jurado: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Arturo Navarro Ocaña, Dr. Jesús Méndez Lozano y Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus valiosas aportaciones.

A los técnicos académicos: M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso (HPLC), Q. Eréndira García Ríos (Espectrometría de masas MALDI-ToF) y M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz (Espectrometría de masas ESI-MS) por su gran ayuda.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo por su gran apoyo permitiéndome trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Daniel Genaro Rosas Ramírez y al Q.B.P. José Silvestre Mendoza Figueroa por compartirme sus valiosos conocimientos y brindarme su amistad.

A mis grandes amigos Irving García, Ana Lilia Yépez, Luis José López, Norberto Sánchez, Karen García, Filiberto Miguel, Julio Quintana, Diego Gallegos, Angélica Legorreta e Isabel Martínez por compartir tantas sonrisas, momentos de simpleza, consejos y crecimiento.

A Ximena Zagal por ser un gran impulso durante una parte de mi maestría.

DEDICATORIA

A mi gran familia: María Regina Manzo Basurto y Samantha Salinas Manzo, por enseñarme todo lo que es necesario saber y por colocar mis pies en tierras donde el amor lo es todo.

“Si yo pensara solamente y reflexionara solamente, sería un monstruo de esos que yo trato de tener bien lejos, bien lejitos, porque la razón cuando vive sola, como supo Goya, genera monstruos. O sea, que soy un sentipensante, yo soy alguien que intenta atar la emoción y la razón, volver a unir la razón y el corazón.”

Eduardo Galeano.

Tabla de contenido

Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
Índice de ecuaciones.....	ix
Siglas y abreviaciones	1
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes.....	4
Malezas.....	4
Control de malezas	5
Clasificación de herbicidas.....	6
Uso.....	6
Selectividad.....	6
Sitio de acción.....	6
Resistencia	10
Contaminación.....	13
Alternativas.....	15
Manejo integral de malezas	15
Agricultura orgánica	15
Control biológico	16
Alelopatía.....	16
Proteínas como fuentes de herbicidas	18
Amaranto como fuente de herbicidas.....	19
3. Planteamiento de problema.....	20
4. Objetivos.....	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
5. Hipótesis	22
6. Metodología	23
Esquema de purificación.....	23
Extracción proteica y crioconcentración.	23
Separación por ultrafiltración.....	24
Separación por cromatografía de exclusión molecular	24
Determinación de volumen total de separación y volumen muerto	24

Calibración de columna de exclusión molecular	25
Separación por cromatografía de fase reversa.....	25
Electroforesis en gel SDS-PAGE	26
MALDI-ToF-MS.....	26
Cuantificación de proteína por BCA en microplaca.....	26
Preparación de agar Murashige-Skoog.....	26
Bioensayo inhibición de crecimiento de radícula.....	27
Bioensayo de crecimiento de raíz en medio líquido.....	27
Bioensayo en disco de hoja	28
Determinación de viabilidad celular mediante monitoreo de actividad alfa-amilasa.....	28
Detección de H ₂ O ₂ mediante tinción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en hoja.....	29
Bioensayo de infiltración en hoja en <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
Análisis estadístico.....	29
7. Resultados y discusión.....	30
Calibración de columna de exclusión molecular	30
Bioensayo con extracto proteico total	32
Bioensayo de fracciones primarias por ultrafiltración.....	34
Bioensayo de fracciones secundarias obtenidas por exclusión molecular.....	36
Purificación por HPLC	38
Espectro de absorbancia UV.....	40
Dicroísmo circular	41
Características estructurales.	42
Rendimiento de purificación.	44
Bioensayos realizados con compuesto puro	45
Bioensayo de crecimiento de raíz en medio líquido.....	46
Bioensayo en disco de hoja	49
Bioensayo de infiltración en hoja en <i>A. thaliana</i>	55
Aplicación probable.....	57
8. Conclusiones.....	58
9. Perspectivas.....	59
10. Anexos.....	60
Composición de medio Murashige-Skoog	60
Composición de medio basal White	61
Certificado de determinación taxonómica	62

Descripción de malezas colectadas	63
Diagrama de respuesta del sistema inmune en plantas.....	68
11. Referencias	69

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la relación entre herbicidas relacionados con la fotosíntesis y su clasificación según el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC). Tomado y modificado del libro Bioactivity of Herbicides (Duke y Dayan, 2011).	7
Figura 2. Esquema de la relación entre herbicidas relacionados con ensamblaje de biopolímeros y su clasificación según el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC). Tomado y modificado de (Duke y Dayan, 2011).	8
Figura 3. Blancos celulares de actividad herbicida y su clasificación según el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC). Tomado y modificado de Délye C, Jasieniuk M, Le Corre V, (Délye <i>et al.</i> , 2013).	9
Figura 4. Representación cronológica de la introducción de los distintos sitios de acción descubiertos. Tomado de (Heap, 2015).	10
Figura 5. Acción de los herbicidas (arriba) después de la aplicación, mecanismos de resistencia identificados (abajo). Tomado y modificado de (Délye <i>et al.</i> , 2013).	11
Figura 6. Gráfica que representa el colapso y recuperación de la población durante el “rescate evolutivo”. Tomado y modificado de (Délye <i>et al.</i> , 2013).	12
Figura 7. Incremento de casos únicos de resistencia a nivel global. Tomado de (Heap, 2015).	13
Figura 8. Los tres procesos primarios que determinan el destino de un herbicida (HB) en el ambiente: adsorción (verde), transporte (rojo) y degradación (azul). Tomado y modificado de (Burke y Bell, 2014).	14
Figura 9. Representación del cultivo de frijol y maíz en Mesoamérica. Tomado del Códice Florentino (Biblioteca digital mundial, 1577).	16
Figura 10. Estructura química de hapalociclamida.	19
Figura 11. Esquema general de purificación guiada por bioensayo.	23
Figura 12. Material usado para crioconcentración. Tomado y modificado de (Virgen-Ortíz <i>et al.</i> , 2012).	24
Figura 13. Exposición de la hoja a la solución de prueba.	28
Figura 14. Ejemplo de distribución de disco de hoja en agar basal White.	28
Figura 15. Cromatograma de exclusión molecular de marcadores de peso molecular 29, 13.7 y 0.7 kDa. Columna: Sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 x 1 cm 50 µm; fase móvil: buffer acetato de amonio pH 9, 50 mM; flujo: 1 mL/min; temp: ambiente; vol. de inyección de 2 mL; detector: UV 280nm.	30
Figura 16. Gráfico de correlación de Kd respecto al log ₁₀ R.	31
Figura 17. Gel de electroforesis de fracción de 1 a 30 kDa (1-30 kDa) y extracto total (ET).	32
Figura 18. Cromatograma de exclusión molecular de extracto total proteico crioconcentrado. Columna: sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 x 1 cm 50 µm; fase móvil: buffer acetato de amonio pH 9 50 mM; flujo: 1 mL/min; temp: ambiente; vol iny: 2 mL; detector: UV 280 nm.	32
Figura 19. Espectro MALDI-TOF obtenido del extracto total proteico sin crioconcentrar.	33
Figura 20. Inhibición de germinación a diferentes concentraciones de extracto total de proteínas, realizado con 30 semillas de <i>Lactuca sativa</i> , (*) representa una diferencia significativa con p<0.01	34
Figura 21. Gráfico de inhibición de germinación a diferentes dosis de correspondiente a las fracciones < 1kDa (azul), 1 -30 kDa (verde) y > 30 kDa (gris), realizado con 30 semillas de <i>Lactuca sativa</i> , (*) representa una diferencia significativa con p<0.01	34
Figura 22. Cromatograma de exclusión molecular de la prefracción de 1 – 30 kDa. Columna: sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 x 1 cm 50 µm; fase móvil: buffer acetato de amonio pH 9 50 mM; flujo: 1mL/min; temp: ambiente; vol iny: 2 mL; detector: UV 280 nm.	35

Figura 23. Espectro MALDI-TOF obtenido de la prefracción de 1 – 30 kDa.....	35
Figura 24. Gráfica de inhibición de germinación a diferentes dosis de correspondiente a los picos obtenidos por exclusión molecular: Pico 1 (azul), Pico 2 (verde) y Pico 3 (gris) realizado con 30 semillas de <i>Lactuca sativa</i> , (*) representa una diferencia significativa con $p<0.01$	36
Figura 25. Espectro MALDI-TOF obtenido del pico 3 de la fracción 1 – 30 kDa.....	37
Figura 26. Cromatograma HPLC-RP del pico 3 proveniente de exclusión molecular (detector 220nm) .	38
Figura 27. Cromatograma del compuesto puro (detector 220nm).	39
Figura 28. Espectro de absorción UV de péptido puro.	40
Figura 29. Espectro de dicroísmo circular de péptido 3.9 aislado por HPLC analizado con el programa CD Analyser system 32 bit V2.02.....	41
Figura 30. Espectro de masas ESI-MS del péptido aislado (arriba), deconvolución del espectro obtenido experimentalmente (abajo).	42
Figura 31. Espectro de masas ESI-MS de péptido reducido y alquilado con iodoacetamida	43
Figura 32. Espectro de masas ESI-MS de péptido digerido con tripsina.....	43
Figura 33. Estructura de monómero de quitina (izquierda) estructura de celulosa (derecha).	44
Figura 39. Inhibición de elongación radicular en malezas realizado con 30 raíces de las respectivas malezas, (*) representa una diferencia significativa con $p<0.01$	46
Figura 40. Inhibición de elongación radicular en plantas comerciales realizado con 30 raíces de las respectivas plantas de cultivo, (*) representa una diferencia significativa con $p<0.01$	47
Figura 41. Comparación de diámetro de halo de hidrólisis de alfa-amilasa entre control y tratado con péptido realizado con 10 discos de las respectivas plantas, (*) representa una diferencia significativa con $p<0.01$	49
Figura 42. Imágenes del agar White + almidón revelado con solución de yodo.	50
Figura 43. Reacción de oxidación de 3,3' – diaminobencidina en presencia de H_2O_2 y peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, 2016).....	51
Figura 44. Imágenes de las tinciones DAB hechas en distintas malezas.....	53
Figura 45. Imágenes de las tinciones DAB hechas en distintas plantas cultivables.....	54
Figura 46. Ejemplo de estrés mecánico debido al corte del disco de hoja en tejido de hoja de maíz con tratamiento control.	54
Figura 47. Monitoreo a 48 h de hoja infiltrada.....	55
Figura 48. Crecimiento de <i>A. thaliana</i> a 4 semanas de tratamiento con péptido.	56
Figura 49. Crecimiento de <i>A. thaliana</i> a 6 semanas de tratamiento con péptido.	56
Figura 34. Invasión de <i>Bidens odorata</i> y <i>Parthenium bipinnatifidum</i> en cultivo de mostaza (izquierda) y <i>Bidens odorata</i> en cultivo de maíz (derecha), fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.	63
Figura 35 <i>Cuscuta</i> sp. afectando cultivo de chíá; fotografía tomada en municipio de Malinalco, Estado de México.....	64
Figura 36. Invasión de <i>Amaranthus hybridus</i> en cultivo de maíz (izquierda), y en cultivo de chíá (derecha) fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.	65
Figura 37. Invasión de <i>Partheniun bipinnatifidum</i> en cultivo de nardo (izquierda), y en cultivo de maíz (derecha) fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.	66
Figura 38. Terreno usado para el cultivo de arroz invadido por <i>Ageratum corymbosum</i> fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.	67

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de herbicidas relacionados a fotosíntesis según HRAC (Burke y Bell, 2014; Duke y Dayan, 2011; Heap, 2015; Green, 2014).....	7
Cuadro 2. Clasificación de herbicidas relacionados con formación y ensamblaje de biopolímeros según HRAC (Burke y Bell 2014; Duke y Dayan, 2011; Heap, 2015.; Green, 2014; Labrada <i>et al.</i> , 2015).....	8
Cuadro 3. Clasificación de los herbicidas según HRAC con otros mecanismos de acción (Burke y Bell, 2014; Duke y Dayan, 2011; Heap, 2015; Green, 2014; Labrada <i>et al.</i> , 2015).....	9
Cuadro 4. Relación de algunas proteínas estudiadas por su fitotoxicidad.	18
Cuadro 5. Gradiente empleado para la purificación por HPLC del pico de interés.	25
Cuadro 6. Cantidades necesarias para la preparación de 2 geles de electroforesis.....	26
Cuadro 7. Semillas empleadas para bioensayo de crecimiento de raíz.....	27
Cuadro 8. Parámetros cromatográficos para columna sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 X 1 cm.....	30
Cuadro 9. Parámetros calculados para la elaboración de la curva de correlación Kd vs. logR.....	31
Cuadro 10. Lista de m/z e intensidad relativa para pico 3 de la fracción 1 – 30 kDa.	37
Cuadro 11. Relación de picos obtenidos en cromatografía de pico 3.	38
Cuadro 12. Relación de picos obtenidos en cromatografía de compuesto puro.	39
Cuadro 13. Resultados de comparación por mínimos cuadrados.	41
Cuadro 14. Inhibición de elongación radicular en malezas.	46
Cuadro 15. Inhibición de elongación de raíz en plantas comerciales.....	47
Cuadro 16. Resumen de resultados arrojados por el bioensayo en disco de hoja.....	54

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Altura de plato teórico.....	24
Ecuación 2. Coeficiente de distribución.....	25
Ecuación 3. Cálculo de porcentaje de inhibición.	27

Siglas y abreviaciones

2,4-D	Ácido 2,4 fenoxiacético
ACCasa	Acetil CoA carboxilasa
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa
ALS	Acetolactato sintasa
C.V.	Coeficiente de variación
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DXS	Deoxyxylulose-5-phosphate saturase
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
HPLC-RP	High Performance Liquid Chromatography Reversed Phase
HPPD	Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
HRAC	Herbicide Resistance Association Committee
K'	Factor de capacidad
LTP	Lipid transfer protein
MALDI-ToF-MS	Matrix assisted laser desorption ionization- time of flight- mass spectrometry
MEXU	Herbario Nacional de México
M-S	Murashige-Skoog
PDS	Phytoene desaturase
Protox	Protopofirinógeno oxidase
RALF	Rapid alcanization factor
VLCFAs	Very long chain fatty acids
WSSA	Weed Science Society of America

Resumen

El amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.) es una planta conocida por su valor nutricional, siendo empleada ampliamente como alimento debido a la gran cantidad de proteínas presentes en sus semillas; sin embargo, dichas proteínas pueden ser empleadas para fines diferentes a los alimenticios, como es el caso del área agrícola. En este trabajo se realizó un aislamiento guiado por un bioensayo para descubrir al un compuesto proteico responsable del con efecto herbicida de la cáscara de la semilla del amaranto. Después de extraer las proteínas solubles en agua a pH 9, se realizaron separaciones por ultrafiltración, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa, obteniéndose un péptido rico en cisteína con una masa monoisotópica de 3909.62 Da, poseyendo tres puentes disulfuro, y una estructura secundaria abundante en giros beta I.

Este péptido demostró tener propiedades fitotóxicas, propiciando marchitez y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hojas de las malezas *Bidens odorata*, *Ageratum corymbosum*, *Cuscuta* sp. y *Parthenium bipinnatifidum* y en plantas de interés comercial como lechuga, jitomate, maíz y sorgo. También, mostro un efecto nocivo sobre el crecimiento general de *Arabidopsis thaliana* y el crecimiento radicular de *Bidens odorata*, *Amaranthus hybridus*, *Cuscuta* sp., *Parthenium bipinnatifidum* y lechuga.

1. Introducción

Desde que la agricultura comenzó a convertirse en una práctica primordial para el sustento y supervivencia de las comunidades humanas, el hombre se ha visto inmerso en la tarea de desarrollar técnicas que le permitan obtener un mayor provecho del trabajo realizado en el campo; dentro de los primeros progresos hechos en el área agronómica se encuentra la selección de plantas cultivables eligiendo las variedades con mejores características nutrimentales, mayor resistencia tanto a factores bióticos o abióticos adversos y altos rendimientos, entre otras.

La agricultura al ser una actividad humana que modifica el ambiente donde se lleva a cabo, provoca cambios bióticos como presencia de una sola especie de plantas en una gran extensión de terreno y abióticos como gran cantidad de nutrientes o humedad que repercuten inmediatamente en la ecología del medio, desencadenando una serie de efectos que el agricultor regularmente considera dañinos, entre éstos es importante mencionar el aumento de poblaciones de animales, plantas y hongos que aprovechan el ambiente rico en factores nutricionales para cubrir sus necesidades. Con el fin de eliminar estas poblaciones dañinas llamadas plagas o pestes, se desarrollaron pesticidas enfocados en su control o eliminación.

Uno de los pesticidas más empleados son los herbicidas y gracias al uso de estas sustancias el agricultor emplea menos tiempo en la labor de eliminar las plantas que afectan su cultivo. El uso de sustancias químicas como herbicidas ha sido descrito desde mucho tiempo atrás, siendo ampliamente usados ácidos y sales de carácter inorgánico hasta antes del siglo XIX; el empleo de herbicidas sintéticos no fue sino hasta después de la segunda guerra mundial, donde el desarrollo científico y tecnológico permitió la síntesis a gran escala de herbicidas, permitiendo cubrir grandes extensiones de tierra cultivable industrializando el campo.

El empleo indiscriminado de pesticidas, alentado por la agricultura intensiva y respaldado por la revolución verde, mostró de manera paulatina ciertos inconvenientes que a largo plazo se tornaron en problemas serios de salud pública y de conservación ambiental, entre los problemas más importantes se encuentra la toxicidad, la bioacumulación, el desarrollo de resistencia, la contaminación de recursos, entre otros.

Debido a la problemática relacionada con el uso de herbicidas clásicos es necesario el estudio y desarrollo de nuevos compuestos con actividad herbicida, que no comprometan la salud de la población humana y a su vez tengan un bajo impacto ecológico.

2. Antecedentes

Malezas

Las malezas han sido definidas desde el punto de vista antropocéntrico como cierto grupo de plantas que crecen fuera de lugar, específicamente en zonas donde afectan la producción agrícola, disminuyendo el rendimiento de los cultivos (Qasem y Foy, 2001); a su vez las plantas de cultivo son consideradas como cualquiera que provea algún material beneficioso para el hombre (Batish *et al.*, 2001b); sin embargo, la intensificación de la agricultura ha propiciado de varias maneras el aumento, la diversificación y la evolución de estas plantas oportunistas (Altieri, 1999).

El éxito de la supervivencia de las malezas se debe a su capacidad de colonizar ambientes perturbados (Singh *et al.*, 2003), un ejemplo de estos ambientes son los cultivos, ecosistemas sumamente alterados donde hay una gran cantidad de factores como nutrientes, humedad y luz (Altieri, 1999), los cuales al no ser completamente aprovechados por la planta cultivada permiten el establecimiento de estas plantas indeseadas.

Las malezas pueden actuar de manera diferente dependiendo del hábitat donde se encuentren; en general, son capaces de consumir recursos ambientales y factores de crecimiento vegetal, son altamente capaces de resistir condiciones ambientales desfavorables (Qasem y Foy, 2001); aunado a esto, en algunos casos ofrecen hábitat a insectos y organismos causantes de enfermedades que afectan en gran medida el rendimiento de los cultivos (Bajwa, 2014).

Dentro de las características que permiten que las malezas se establezcan en una gran cantidad de ecosistemas de una manera exitosa son:

1. Requerimientos mínimos de germinación cubiertos.
2. Longevidad de la semilla y germinación discontinua.
3. Rápido paso de la fase vegetativa a la floral.
4. Producción continua de semillas.
5. Producción de semillas sin polinización externa.
6. Adaptación a la polinización cruzada por polinizadores no específicos o por viento.
7. Gran producción de semillas en condiciones favorables para la planta.
8. Producción de semillas en una gran cantidad de condiciones.
9. Adaptación de dispersión a corta y larga distancia.
10. Si es perenne posee una gran reproducción vegetativa o regeneración por fragmentos.
11. Si es perenne es quebradiza y difícil de arrancar del suelo.
12. Puede competir inter-específicamente de diversas formas (producción de aleloquímicos, incremento de obstrucción impidiendo el crecimiento de otras plantas, crecimiento en forma de rosetas) (Baker, 1974).

A pesar de que las malezas constituyen el 1% de las plantas existentes en la tierra (Qasem y Foy, 2001), las continuas manipulaciones de los campos han favorecido la selección de malezas cada vez más competitivas y agresivas (Altieri, 1999) por lo que el empleo de auxiliares para el control de crecimiento de malezas ha sido sumamente importante en el sector económico primario.

Control de malezas

Así como las malezas han acompañado a los cultivos desde el inicio de la agricultura, el manejo de estas plantas invasoras ha sido una práctica constante; el objetivo principal en las prácticas de control de malezas es manejar la proporción cultivo/maleza a favor de un crecimiento mayor del cultivo, centrando los esfuerzos en prevenir la reproducción, interrumpir el reciclaje y/o reducir las condiciones que permiten la invasión de malezas (Altieri, 1999).

En prácticas tempranas el control de malezas se realizaba únicamente mediante deshierbe manual y a medida que el conocimiento de la biología de las malezas avanzó, el modo de control de malezas fue evolucionando.

Dentro de los métodos mecánicos de manejo de malezas se encuentran:

1. Arado: consiste en remover el suelo antes de cultivar para dejar al descubierto raíces de malezas y destruir las plantas existentes.
2. Deshierbe manual: elimina selectivamente malezas empleando herramientas simples, teniendo la desventaja de consumir más tiempo que el arado.
3. Siega y recorte: tiene el objetivo de disminuir el tamaño de las malezas y evitar que se propaguen las semillas.
4. Acolchado: Evita el crecimiento de malezas mediante el empleo de material vegetal que evita el paso de luz y agua a las semillas, emplea material vegetal que en descomposición o por sus lixiviados que preferentemente tengan un efecto nocivo sobre las semillas de maleza.
5. Solarización: esta técnica emplea plástico que evita el paso de agua pero permite el paso de luz solar, calentando el suelo y matando las semillas de maleza (Preston, 2014).

El avance en el manejo de malezas se dio gracias al descubrimiento en los años 1940 del 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y otros reguladores sintéticos del crecimiento vegetal; al emplear el 2,4-D como el primer herbicida selectivo se inaugura la era del uso de sustancias químicas capaces de controlar o suprimir el crecimiento de plantas (Burke y Bell, 2014), permitiendo un aumento en el rendimiento de los cultivos de hasta un 31% (Altieri, 1999); sin embargo, las pérdidas causadas por el efecto de las malezas siguen alcanzando hasta un 25% en países en desarrollo (Gonzalez-Andujar, 2008). A pesar de la existencia de una gran variedad de métodos para evitar la influencia negativa de las malezas en los cultivos, el uso de herbicidas es la práctica de control mayormente empleada en el mundo, constituyendo en países desarrollados como los Estados Unidos una inversión anual de 15 billones de dólares (Gonzalez-Andujar, 2008). El uso de herbicidas ha permitido reducir de una manera importante la labor del agricultor, dando la posibilidad de abarcar una mayor extensión de terreno, permitiendo disminuir o eliminar el proceso de arado (Burke y Bell, 2014) y haciendo más sencillo el establecimiento de monocultivos libres de malezas (Altieri, 1999).

Al establecerse un mayor uso de herbicidas en los huertos, viñedos y hasta en pastizales se ha promovido el desarrollo de distintos herbicidas con diversas características; desde los años 1940 se han desarrollado más de 130 herbicidas selectivos y, aproximadamente, 30 no selectivos (Burke y Bell, 2014) los cuales a su vez han sido incorporados en diversas formulaciones con uno o más herbicidas como principios activos, lo cual ha incrementado la cantidad de presentaciones comercializadas en el mundo.

Clasificación de herbicidas

Es importante tener en cuenta que la acción de los herbicidas; al igual que los fármacos, depende del modo de aplicación, la fisicoquímica del principio, el metabolismo del cultivo y la maleza, las condiciones medioambientales y combinación con otras técnicas agrícolas (Duke y Dayan, 2011; Preston, 2014). Debido a la amplia gama de herbicidas utilizados en la actualidad, es necesario agruparlos de acuerdo a sus distintas propiedades por lo que a continuación se mencionarán cuatro modos de clasificar a estos compuestos según su uso, selectividad, sitio de acción y origen.

Uso

El uso del herbicida depende mucho de su modo de acción, así como de sus propiedades fisicoquímicas y del estadio tanto del cultivo como de la maleza, los herbicidas pueden ser usados de dos maneras:

- Herbicidas de preemergencia: también denominados herbicidas residuales, pueden ser aplicados directamente al suelo encargándose de inhibir la germinación de las semillas de maleza y pueden ser usados antes de sembrar el cultivo de interés, justo después de la cosecha o incluso en cultivos perennes como viñedos se puede utilizar a la par del crecimiento de la planta de interés (Preston, 2014).
- Herbicidas de postemergencia: este tipo de herbicidas tienen un uso más flexible, ya que deben ser aplicados cuando la maleza haya germinado, y no deben ser usados cuando la maleza se haga presente (Preston, 2014).

Selectividad

La selectividad es uno de los factores más importantes a considerar en un herbicida, siendo un herbicida selectivo aquel que después de su aplicación es mortal para la maleza y no para el cultivo (Burke y Bell, 2014), típicamente el herbicida es selectivo para las malezas debido a que la planta de cultivo es capaz de degradar al herbicida antes de que tenga efecto sobre ella (Duke y Dayan, 2011); en otras palabras se metaboliza en forma selectiva.

Por otro lado existen los herbicidas de amplio espectro, los cuales de manera no selectiva tienen como blanco todas las especies vegetales, siendo capaces de acabar con malezas y cultivos (Duke y Dayan, 2011); a pesar de no parecerlo, estos herbicidas son bastante útiles, ya que pueden eliminar una gran cantidad de vegetación no deseada, siendo de gran ayuda cuando el cultivo no está presente o cuando está físicamente protegido (Preston, 2014).

Sitio de acción

La mayoría de los herbicidas actúan inhibiendo un sólo proceso enzimático dentro de la planta, lo cual puede ocasionar su muerte de una manera directa o puede provocar la muerte a causa de reacciones secundarias resultado de la inhibición de ese sitio enzimático (Preston, 2014); hasta el momento, los agricultores tienen acceso a más de 200 principios activos con diferentes modos de acción. La Sociedad Americana de Ciencia en Malezas (WSSA por sus siglas en inglés) en conjunto con el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC por sus siglas en inglés) han desarrollado un sistema de clasificación de los sitios de acción de los herbicidas desarrollados hasta el momento, reportándose herbicidas con 20 sitios de acción diferentes y un pequeño grupo de herbicidas con mecanismo desconocido (Green, 2014; Heap, 2015).

ANTECEDENTES

Para poder estudiar de mejor manera los herbicidas existentes hasta el momento se han dividido en tres grupos, siendo los relacionados con procesos fotosintéticos mencionados en el cuadro 1 y figura 1; éstos abarcan una gran cantidad de sitios blanco, los cuales como se observa en la tabla 1, pueden conferir al herbicida diferente selectividad y uso.

Cuadro 1. Clasificación de herbicidas relacionados a fotosíntesis según HRAC (Burke y Bell, 2014; Duke y Dayan, 2011; Heap, 2015; Green, 2014).

Afecta	Grupo	Acción	Uso	Selectividad
Fotosistema	C ₁ , C ₂ y C ₃	Inhibidores de fotosistema II	Post-emergencia	Selectivo
	D	Inhibidores de fotosistema I	Post-emergencia	No Selectivo
Síntesis de pigmentos	F ₁ , F ₃ y F ₄	Inhibidor de biosíntesis de carotenoides (PDS y DXS)	Pre-emergencia Post-emergencia temprana	
	F ₂	Inhibidores de la 4-dihidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD)	Pre-emergencia Post-emergencia	Selectivo
	E	Inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (Protox)	Post-emergencia	Selectivo

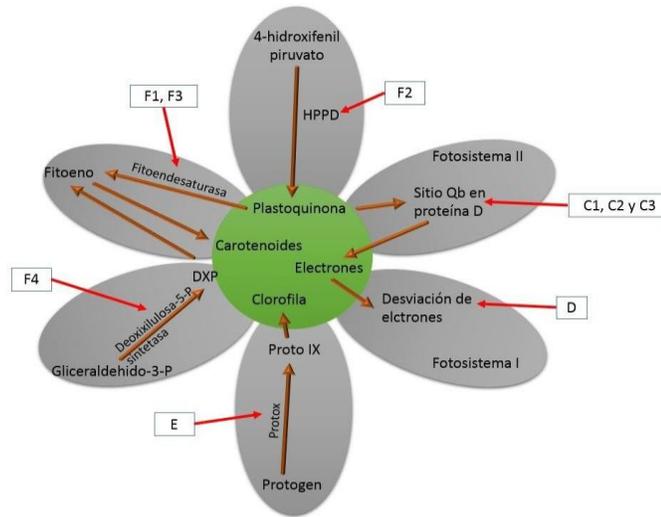


Figura 1. Esquema de la relación entre herbicidas relacionados con la fotosíntesis y su clasificación según el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC). Tomado y modificado del libro *Bioactivity of Herbicides* (Duke y Dayan, 2011).

ANTECEDENTES

Otro gran grupo de herbicidas es el que interfiere con la formación y ensamblaje de biopolímeros, los cuales son mostrados en el cuadro 2 y figura 2; éstos herbicidas al igual que los encargados de inhibir procesos fotosintéticos, son capaces de presentar usos de pre y post emergencia y mostrar amplio espectro o selectividad hacia malezas.

Cuadro 2. Clasificación de herbicidas relacionados con formación y ensamblaje de biopolimeros según HRAC (Burke y Bell 2014; Duke y Dayan, 2011; Heap, 2015.; Green, 2014; Labrada *et al.*, 2015).

Afecta	Grupo	Acción	Uso	Selectividad
Síntesis de pared celular	L	Inhibidores de complejo celulosa sintetasa		No Selectivo
Síntesis de lípidos	A	Inhibidor de Acetil CoA Carboxilasa	Post-emergencia	Selectivo
	K ₃	Inhibidores de elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs)	Pre-emergencia	No selectivo
	N	Inhibidor de biosíntesis de ácidos grasos	Pre-emergencia	
Síntesis de aminoácidos	G	Inhibidor de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa	Post-emergencia	No selectivo
	B	Inhibidores de Ácido acetohidroxi sintetasa/Acetolactato sintetasa	Post-emergencia	Selectivo
	H	Inhibidores de la glutamina sintetasa	Post-emergencia	No selectivo
Tubulina	K ₁ y K ₂	Inhibidores de ensamblaje de microtúbulos	Pre-emergencia	Selectivo

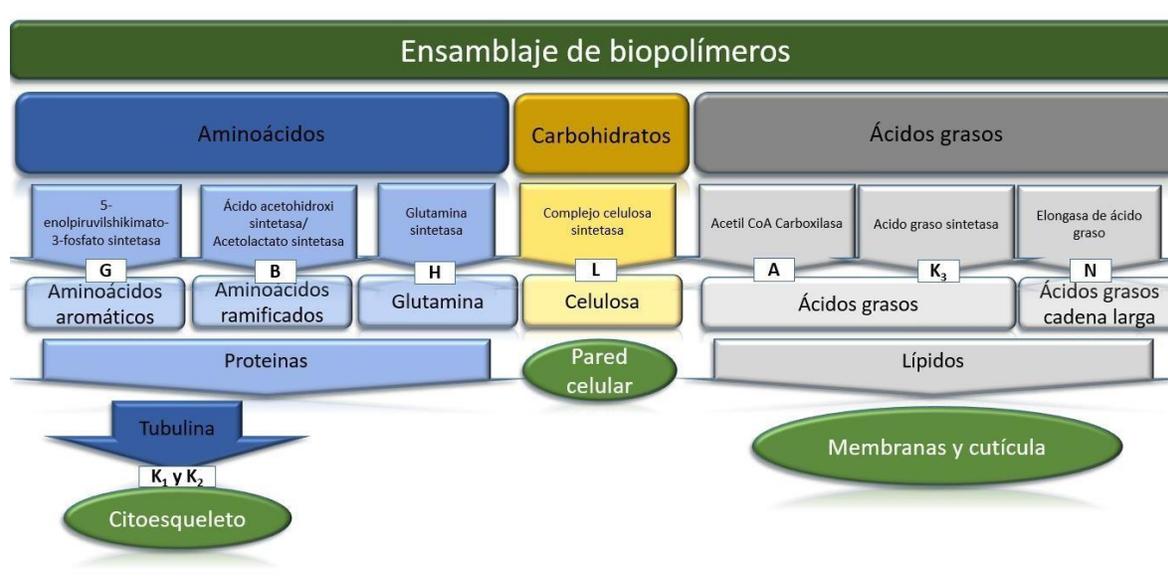


Figura 2. Esquema de la relación entre herbicidas relacionados con ensamblaje de biopolímeros y su clasificación según el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC). Tomado y modificado de (Duke y Dayan, 2011).

ANTECEDENTES

La tercera agrupación de herbicidas, contiene a todos aquellos que no intervienen en el ensamblaje de biopolímeros o la fotosíntesis; por lo que ésta abarca desde inhibidores de síntesis de ATP, hasta mimetizadores hormonales (cuadro 3 y figura 3).

Cuadro 3. Clasificación de los herbicidas según HRAC con otros mecanismos de acción (Burke y Bell, 2014; Duke y Dayan, 2011; Heap, 2015; Green, 2014; Labrada *et al.*, 2015).

Afecta	Grupo	Acción	Uso	Selectividad
Elongación celular y crecimiento	O	Mimetizadores de auxinas	Post- emergencia	Selectivo
	P	Inhibidor de transporte de auxina	Post- emergencia	Selectivo
	I	Inhibidor de dihidropteroato sintetasa	Post- emergencia	Selectivo
	M	Desacopladores de fosforilación oxidativa		No selectivo

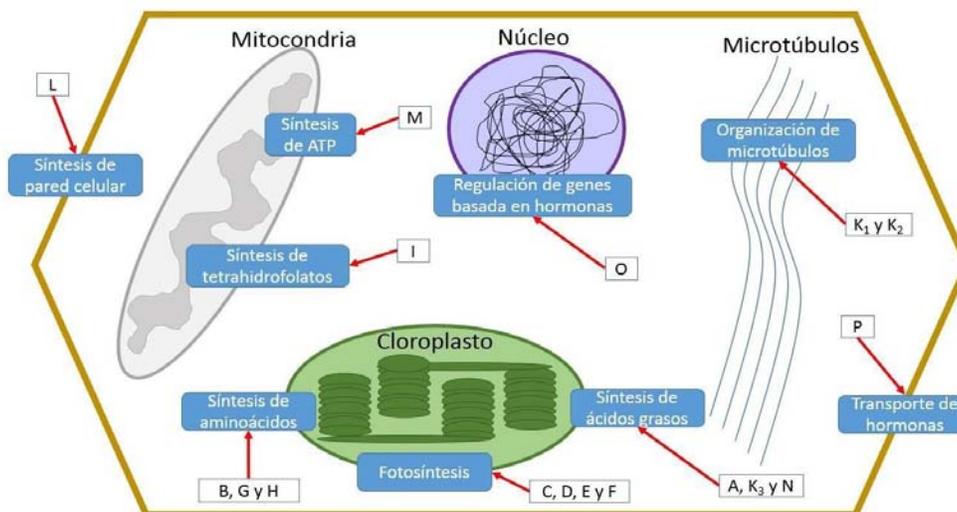


Figura 3. Blancos celulares de actividad herbicida y su clasificación según el Comité de Acción en Resistencia a Herbicidas (HRAC). Tomado y modificado de Délye C, Jasieniuk M, Le Corre V, (Délye *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

A pesar de la existencia de una gran cantidad de herbicidas descubiertos, los mecanismos de acción continúan siendo los mismos (ver figura 4); lo cual presenta una oportunidad para investigar sitios de acción alternativos para compuestos novedosos; a su vez, la existencia de pocos sitios de acción presenta desventajas, ya que con el uso indiscriminado de herbicidas, se ha presentado una gran cantidad de casos de resistencia.



Figura 4. Representación cronológica de la introducción de los distintos sitios de acción descubiertos. Tomado de (Heap, 2015).

Resistencia

La resistencia a herbicidas es la habilidad natural e inherente de ciertos biotipos de malezas dentro de una población para sobrevivir a una exposición del herbicida que normalmente controlaría de manera efectiva a la población en cuestión (Heap, 1997). Ésta resistencia es resultado de una evolución adaptativa por parte de las malezas gracias a la intensa presión selectiva ejercida por los herbicidas (Délye *et al.*, 2013), dando como resultado una población donde los individuos sensibles han desaparecido paulatinamente dejando el lugar a los biotipos resistentes.

La presión selectiva está definida como la efectividad con la que un herbicida selecciona individuos resistentes dentro de una población, ésta es directamente proporcional a la eficacia del herbicida (Shane Friesen *et al.*, 2000). Para que una población de especies desarrolle el biotipo resistente debe comenzar por la aparición de individuos resistentes, los cuales desarrollan menor sensibilidad a causa de mutaciones genéticas que afectan al menos a uno de los siguientes aspectos:

- Sitio de acción del herbicida.
- Sistemas metabólicos.
- Translocación o secuestro.
- Absorción (Shane Friesen *et al.*, 2000; Délye *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

La figura 5 muestra cada uno de los pasos subsiguientes a la aplicación del herbicida y su correspondiente mecanismo de resistencia.

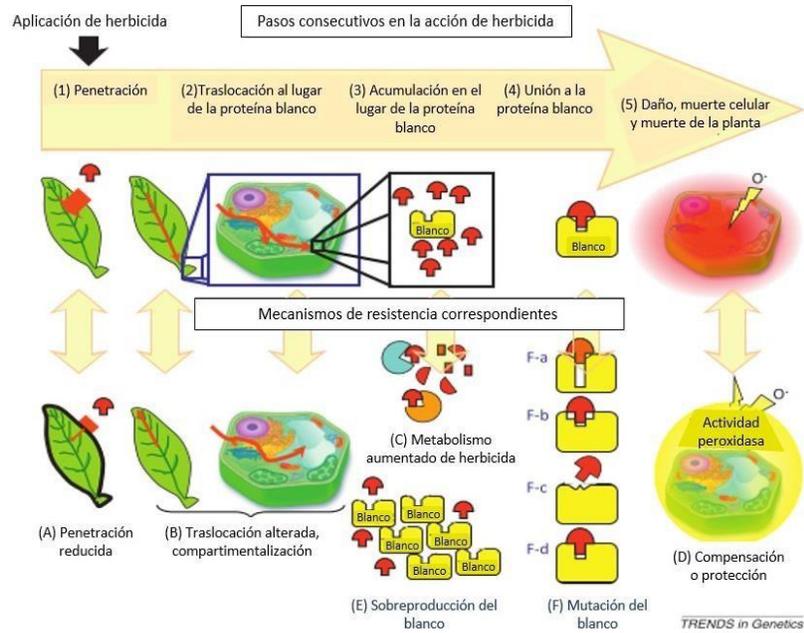


Figura 5. Acción de los herbicidas (arriba) después de la aplicación, mecanismos de resistencia identificados (abajo). Tomado y modificado de (Délye *et al.*, 2013).

El hecho de manifestarse diferentes mutaciones genéticas en un corto periodo de tiempo se explica por el “rescate evolutivo” el cual integra las mutaciones monogénicas para la resistencia en el sitio de acción (proteínas alteradas) y las mutaciones poligénicas complejas que conducen a la resistencia no relacionada con un sitio de acción (rutas metabólicas alteradas); éste rescate ocurre cuando una población enfrenta un cambio ambiental suficientemente brusco como para poder llevarla a la extinción, y es capaz de adaptarse genéticamente para permitir una adaptación demográfica (Délye *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

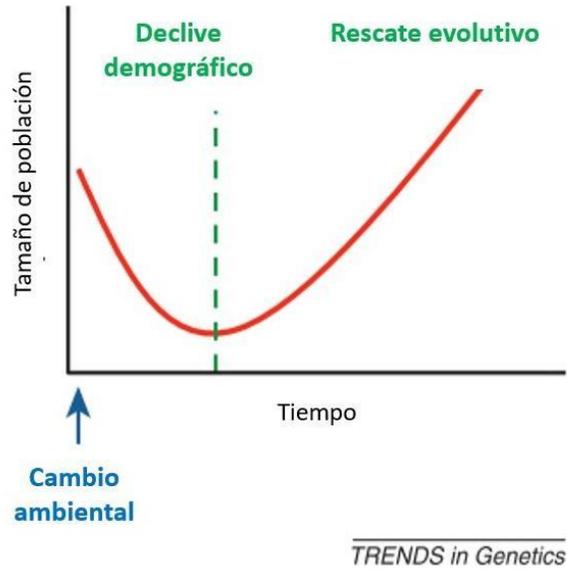


Figura 6. Gráfica que representa el colapso y recuperación de la población durante el “rescate evolutivo”. Tomado y modificado de (Délye *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que debido a estos mecanismos, la resistencia a herbicidas no puede ser evitada, ya que ocurre de manera aleatoria (Shane Friesen *et al.*, 2000), pudiendo deberse a la transferencia de genes de una población resistente a herbicida de la misma especie o especies relacionadas o polinización cruzada, transferencia horizontal debida a microorganismos como bacterias o virus (Sandermann, 2006). No es sorpresa encontrar que la mayoría de los casos reportados de biotipos resistentes a herbicidas se hayan presentado en países donde los herbicidas son el principal método de control de malezas, siendo Estados Unidos el primer lugar con 152 biotipos de malezas, seguido por Australia con 76 y en tercer lugar Canadá con 61 (Heap, 1997; Heap, 2015). La figura 7 ilustra el incremento cronológico de casos únicos de malezas resistentes, donde cada caso representa la resistencia de una especie a un sitio de acción, pudiéndose observar, un gran incremento en los casos descritos, el cual parece no disminuir.

ANTECEDENTES

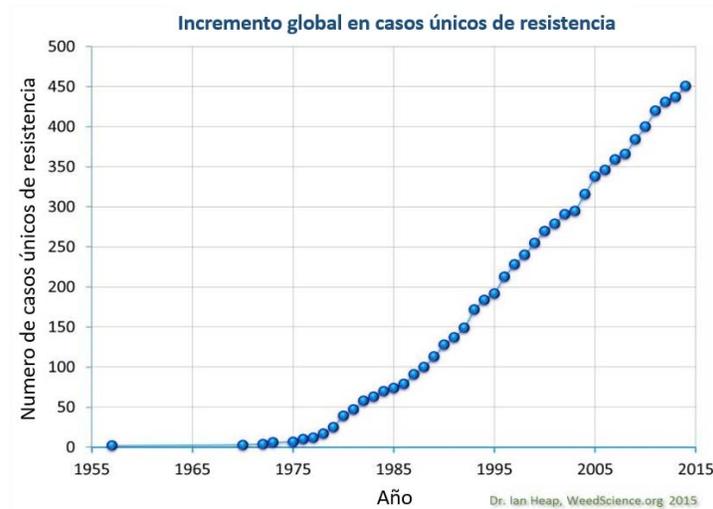


Figura 7. Incremento de casos únicos de resistencia a nivel global. Tomado de (Heap, 2015).

Dentro de los métodos desarrollados para lidiar con la resistencia se encuentra, el desarrollo de cultivos genéticamente modificados resistentes a herbicidas, a los cuales se les ha podido conferir resistencia a varios grupos combinados como:

- Grupo G (glifosato).
- Grupo H (glufosinato).
- Grupo B (inhibidores de acetolactato sintasa / acetohidroxiácido sintasa (ALS/AHAS).
- Grupo F2 (Inhibidores de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD).
- Grupo O (auxinas sintéticas) (Beckie y Hall, 2014).

Se ha reportado incluso la inducción de resistencia combinada a varios grupos en una misma planta, las cuales incluyen: resistencia a glifosato y dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) por soya y resistencia a glifosato y grupo A por maíz, algodón y soya (Beckie y Hall, 2014); la estrategia de combinar la inocuidad de herbicidas en un mismo cultivo permite el uso de mezclas de herbicidas para asegurar un buen manejo de malezas resistentes, siendo aprovechados distintos mecanismos de acción para combatir a la maleza y, en teoría, evitar su resistencia; es importante mencionar que esta estrategia sigue siendo tema de debate (Beckie y Hall, 2014; Beckie y Tardif, 2012).

Contaminación

Debido al uso extensivo de estos compuestos ha surgido un gran problema ambiental, ya que debido a las propiedades fisicoquímicas que presentan se ha propiciado la deriva y disipación de herbicidas, provocando contaminación en suelo, aire y agua (Burke y Bell, 2014). Esta contaminación puede deberse a prácticas agrícolas deficientes, como mala elección de herbicida, condiciones de equipo, modo de aplicación, etc. Sin embargo, las características medioambientales son un factor importante en la gravedad de la contaminación (Bellec *et al.*, 2015). Los procesos principales (Figura 8) que determinan el grado de capacidad contaminante de un herbicida son:

ANTECEDENTES

- Adsorción: es el principal factor que determina la persistencia del compuesto, es afectado por la cantidad de agua presente, naturaleza fisicoquímica del herbicida y la composición del suelo (Burke y Bell, 2014).
- Transporte: Depende en gran manera del movimiento del agua (lixiviación, escorrentía y difusión capilar), aunque también puede deberse a volatilización, deriva de partículas o erosión del suelo (arado) (Egan *et al.*, 2014; Bellec *et al.*, 2015; Burke y Bell, 2014).
- Degradación: Determinado por la adsorción, cantidad de agua y temperatura; puede ser biótica por medio de microorganismos o abiótica principalmente por hidrólisis o fotólisis (Burke y Bell, 2014; Bellec *et al.*, 2015).

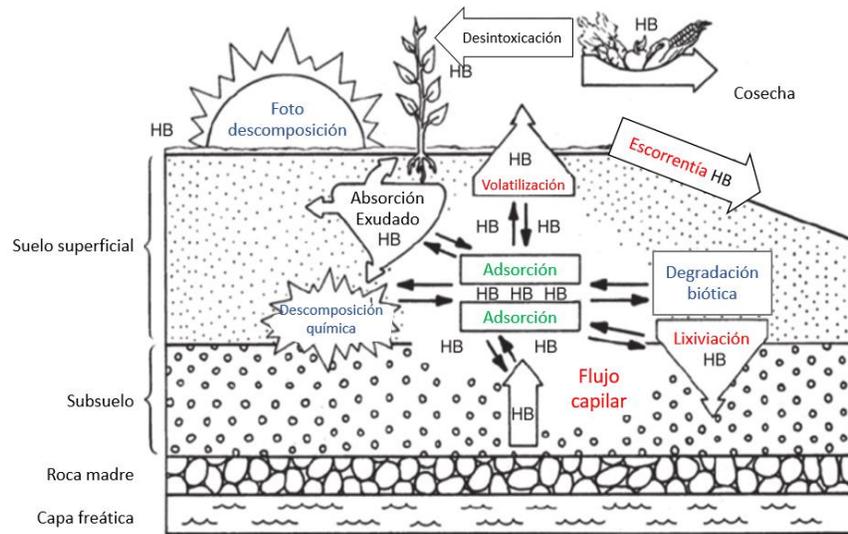


Figura 8. Los tres procesos primarios que determinan el destino de un herbicida (HB) en el ambiente: adsorción (verde), transporte (rojo) y degradación (azul). Tomado y modificado de (Burke y Bell, 2014).

Como ejemplo de herbicida contaminante se puede mencionar el glifosato, éste es ampliamente usado en cultivos con resistencia a herbicida conferida genéticamente, y presenta casos de contaminación al ser un compuesto con un alto coeficiente de dispersión debida a la escorrentía (Syam *et al.*, 2014).

Una de las tantas desventajas de la dispersión por volatilización, escorrentía y deriva, es la perturbación a especies vegetales que no son el objetivo de la aplicación, provocando afecciones en partes vegetativas durante el crecimiento o efectos en producción de semillas (Boutin *et al.*, 2014), pudiendo incluso encontrarse trazas de herbicida acarreadas por partículas de polvo a la atmósfera, manifestándose en la lluvia (Egan *et al.*, 2014). Por lo tanto es necesario crear nuevas estrategias y herramientas para poder disminuir o evitar la contaminación por herbicidas, así como implementar protocolos que ayuden a disminuir la aparición de malezas resistentes.

Alternativas

El hecho de que el uso indiscriminado de agroquímicos haya desencadenado una gran contaminación ambiental, decremento en la fertilidad de suelos, disminución en la inmunidad y vitalidad de plantas, decremento de la biodiversidad, disminución en la calidad alimentaria y repercusiones en la salud humana (Srutek y Urban, 2008), ha llevado a la investigación y desarrollo de nuevos modelos de control de malezas, los cuales buscan reducir al máximo las consecuencias dañinas exhibidas por estas sustancias.

Manejo integral de malezas

Una de las estrategias empleadas para evitar el uso de herbicidas ha sido el llamado “manejo integral de malezas”; que al contrario de la estrategia de “control de malezas” donde los herbicidas son la principal herramienta para eliminar estas plantas indeseadas, se promueve el uso racional de herbicidas no dependiendo únicamente de los compuestos desarrollados para cierto sitio de acción; estas estrategias pretenden manejar la incidencia de malezas empleando diversas técnicas de cultivo, las cuales se apoyan en factores bióticos y abióticos para poder aminorar el número de plantas indeseables en los cultivos y otorgar mayor flexibilidad y opciones de control a los agricultores (Altieri, 1999).

Principalmente el manejo integral de malezas se hace énfasis en tres enfoques, los cuales abarcan:

- Reducción de propágulos producidos.
- Reducción de aparición de malezas.
- Reducción al mínimo de interferencia y competencia con malezas.

Todo esto se hace mediante el uso en conjunto de prácticas de cultivo, labranza y prácticas con herbicida (Altieri, 1999).

Agricultura orgánica

A su vez se han propagado las prácticas de agricultura orgánica, la cual busca reducir o eliminar el uso de pesticidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas) y fertilizantes inorgánicos, buscando la conservación y uso de hábitats no cultivables y la preservación de la agricultura mixta (Srutek y Urban, 2008).

La agricultura mixta es una práctica ampliamente usada en la agricultura tradicional de Asia, África y Latinoamérica (Figura 9), ésta consiste en cultivar al mismo tiempo y en el mismo terreno mezclas de plantas, las cuales resultan ser más productivas en conjunto de lo que serían por su cuenta (Reigosa *et al.*, 2006); como ejemplo se encuentra la milpa, la cual es un sistema ampliamente empleado en Mesoamérica desde tiempos prehispánicos, en éste sistema se cultivan de manera conjunta el maíz, frijol y calabaza o chayote (Parsons *et al.*, 2009). Ésta mezcla permite tener rendimientos hasta 50% mayores de los que tendría cada cultivo por cuenta propia; se ha observado que el frijol en presencia de maíz presenta una mayor nodulación por lo cual fija una mayor cantidad de nitrógeno, siendo beneficioso para el maíz; a su vez, la planta de calabaza al poseer hojas anchas y crecer cerca del suelo, no permite el paso del sol e impide el crecimiento de malezas (Edwards *et al.*, 1990).



Figura 9. Representación del cultivo de frijol y maíz en Mesoamérica. Tomado del Códice Florentino (Biblioteca digital mundial, 1577).

Control biológico

El control biológico es el manejo de especies invasoras mediante el uso de depredadores, parásitos, herbívoros o por competencia (Middleton, 2008), según la WSSA (Weed Science Society of America) el control biológico consiste en el uso de un agente, conjunto de agentes o procesos biológicos que permitan la supresión de malezas; por lo tanto, es posible emplear microorganismos o macroorganismos, siendo viable el uso de animales como aves, peces, artrópodos, entre otros; también pueden usarse patógenos vegetales como hongos, bacterias, virus o nematodos (Weed Science Society of America, 2015).

Debido a que los bioherbicidas no tienen efectos residuales en el medio ambiente o en los cultivos, y son sumamente específicos, éste es un método adecuado como alternativa para el uso de herbicidas tradicionales; se ha observado que el empleo de combinaciones específicas de organismos es capaz de controlar de manera eficiente las malezas dentro de un cultivo (Bajwa, 2014). También, es importante mencionar que éste tipo de control no causa la extinción local de malezas, únicamente las controla teniéndolas a un grado que asegura un buen rendimiento en el cultivo (Preston, 2014).

Se ha reportado el uso de micotoxinas producidas por *Fusarium* como inhibidores de germinación, y transformantes de *Azotobacter* sp. y *E. coli* como promotores de germinación en malezas parásitas (Reigosa *et al.*, 2006).

En ocasiones, el biocontrol puede ser logrado mediante el empleo de parásitos provenientes de la misma región de donde la maleza es endémica; sin embargo, el riesgo ecológico de introducir otra especie foránea es poco predecible, a su vez el uso de parásitos puede fallar debido a que las condiciones ambientales en el ambiente invadido no son parecidas a las nativas (Middleton, 2008).

Alelopatía

Una estrategia ampliamente usada para aminorar la cantidad de plantas no deseadas presentes en los cultivos es el aprovechamiento de las propiedades alelopáticas de ciertos cultivos sobre las malezas; la alelopatía es un fenómeno ecológico natural donde algún organismo afecta el funcionamiento de otro en su vecindad mediante la liberación de metabolitos secundarios, los cuales pueden tener un efecto positivo o negativo en el organismo receptor (Bajwa, 2014).

Esto ha sido ampliamente estudiado en campo y presenta resultados satisfactorios en el manejo de malezas, sus efectos pueden ser:

ANTECEDENTES

- Cambio en crecimiento, productividad y rendimiento.
- Desbalance en nutrientes y población microbiana en suelo (Batish *et al.*, 2001a).

Se han encontrado buenos resultados en la inhibición de malezas por parte de cultivos como alfalfa, arroz, pepino, girasol, trigo, centeno, sorgo, entre otros (Khanh *et al.*, 2005; Reigosa *et al.*, 2006); los compuestos fitotóxicos pueden encontrarse prácticamente en todas las partes de la planta como en raíz, hojas, tronco, polen, semillas, frutas, corteza o rizomas; éstos han demostrado tener efectos negativos en la germinación y desarrollo de malezas (Khanh *et al.*, 2005; Qasem y Foy, 2001).

Debido al modo de liberación de agentes fitotóxicos por parte de los cultivos, las prácticas culturales que aprovechan la alelopatía son variadas, éstas pueden ser:

- Combinación de cultivos: ésta técnica combina cultivos que por sí solos son afectados por las malezas pero que en combinación permiten una inhibición considerable, dentro de las combinaciones reportadas se encuentra la combinación de yuca y frijol y el empleo en conjunto de sorgo, cebada y trébol rojo, entre otros (Altieri, 1999).
- Acolchado alelopático: esta práctica emplea material vegetal residual, el cual cubre el suelo reduciendo la cantidad de luz incidente, aumentando la población de organismos anaeróbicos que producen compuestos de bajo peso molecular y produciendo lixiviados alelopáticos, lo cual en conjunto afecta la germinación o desarrollo de malezas (Altieri, 1999; Batish *et al.*, 2001a).
- Rotación de cultivos: consiste en alternar el cultivo de distintas plantas en los distintos ciclos agrícolas, con el objetivo de aprovechar sus efectos alelopáticos y no permitir el desarrollo de resistencia por parte de las malezas, está reportada la disminución de la incidencia de malezas en la rotación de soya-trigo-maíz (Batish *et al.*, 2001a; Khanh *et al.*, 2005).
- Cultivos de cubierta: empleados principalmente para conservar la humedad, enriquecer los nutrientes del suelo y como forraje; si son empleados cultivos alelopáticos puede alcanzarse supresión de malezas, como ha sido reportado para cultivos de cubierta como sorgo, trigo, camote, maíz, entre otros (Batish *et al.*, 2001a; Khanh *et al.*, 2005).

Los compuestos alelopáticos están compuestos por una enorme diversidad de estructuras químicas, pudiéndose encontrar compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides, ácidos grasos, aminoácidos, entre otros (Singh *et al.*, 2003).

Proteínas como fuentes de herbicidas

Dentro de la gran variedad de compuestos con propiedades alelopáticas encontrados, se ha descubierto la presencia de aminoácidos, péptidos y proteínas que afectan el desarrollo de algunas plantas; como se ha mencionado previamente, éstos son producidos por un organismo ajeno y generan respuestas específicas en la planta objetivo.

La aparición de compuestos peptídicos en el área de la fitopatología no es reciente, siendo descritos compuestos proteicos y peptídicos como factores de virulencia en ciertos hongos fitopatógenos como: *Fusarium solani*, *Cladosporium fulvum*, *Ophiostoma novo-ulmi*, *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*, *Rhynchosporium secalis*, *Phytophthora cactorum*, *Stagonospora nodorum* y *Pyrenophora tritici-repentis* (Sarpeleh et al., 2008).

Algunos de los microorganismos conocidos por producir proteínas con efecto fitotóxico se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Relación de algunas proteínas estudiadas por su fitotoxicidad.

Organismo productor	Tipo	Organismo susceptible	Provoca	Ref
<i>Phoma eupyrena</i> (hongo)	Glicoproteína 65 kDa	<i>Pistia stratiotes</i> (lechuga de agua)	Necrosis	(Babu et al., 2003)
<i>Phoma tracheiphila</i> (hongo)	Glicoproteínas 60 y 93 kDa	Cítricos	Mal secco	(Babu et al., 2003; Fogliano et al., 1998)
<i>Ceratocystis ulmi</i> (hongo)	Glicoproteína	Olmo	Marchitez	(Friend, 2012)
<i>Corynebacterium incidosum</i> (bacteria)	Glicoproteína	Alfalfa	Marchitez	(Friend, 2012)
<i>Ceratocystis fimbriata</i> (hongo)	Proteína 12.8 kDa	Plátano	Muerte celular	(Carresi et al., 2006)
<i>Rhynchosporium secalis</i> (hongo)	Glicoproteína	Cebada	Clorosis	(Mazars et al., 1984)
<i>Pyrenophora teres</i> (hongo)	Proteína 13.2 kDa	Cebada	Clorosis Necrosis	(Sarpeleh et al., 2008)

Aunque hay una gran cantidad de proteínas también es importante mencionar la presencia de péptidos con actividad fitotóxica; uno de ellos es el pigmento peptídico PKZh-1, el cual es producido por *Verticillium* sp. un hongo patógeno conocido por afectar cultivos de papa, algodón y tomate (Buchner et al., 1989); este péptido modificado consta de una cadena de 27 residuos de aminoácidos unida por el carbono terminal mediante un enlace éster a uno de los grupos hidroxilo de la 2, 5, 7-trihidroxi- 1, 4-naftoquinona, el análisis de este péptido muestra la secuencia de aminoácidos siguiente:

Gly-Asp-Val-Glu-Lys-Cys-Ser-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys-Ser-Met-Gly-Ile-Gly-Tyr-Leu-Gly-Arg-Ala-Thr-Asn-Glu (Ten et al. 1982).

Otro péptido modificado que ha presentado una gran actividad como fitotóxico es el compuesto hapalociclámidico, el cual es un hexapéptido cíclico aislado a partir de la cianobacteria *Hapalosiphon* sp.

ANTECEDENTES

Este compuesto consta de fenilalanina, alanina y tres aminoácidos modificados provenientes de la cisteína mostrados en la figura 10; el compuesto ha demostrado inhibir el crecimiento de plántulas de lechuga (Koodkaew *et al.*, 2012) mediante la inhibición de mitosis en las raíces, induciendo una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y disminuyendo la viabilidad de las células en la raíz (Koodkaew *et al.*, 2012).

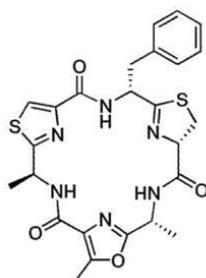


Figura 10. Estructura química de hapalociclámido.

La presencia de cadenas peptídicas cortas con actividad fitotóxica es también importante; se describió un péptido constituido por tres aminoácidos Gly-Ser-Gln producido por el hongo *Excerohilum turcicum*, el cual inhibe la síntesis de clorofila y elongación de radícula en plántulas de maíz (Bashan *et al.*, 1996).

La actividad fitotóxica de ciertas cadenas cortas de aminoácidos ha dado pie al empleo de este tipo de compuestos como herbicidas alternativos a los ya antes mencionados; un ejemplo de ésta nueva perspectiva es el empleo de hidrolizado de gluten de maíz en el control de malezas, éste método patentado en 1991, aprovecha la fitotoxicidad de los compuestos Gln-Gln, Gly-Ala, Ala-Glu, Ala-Asp, Ala-Ala y Leu-Ser-Pro-Ala-Glu como herbicidas de preemergencia, aplicándolos mediante aspersión al suelo o de forma granular, permitiendo tener un control de malezas y una fuente de nitrógeno en cultivos de hortalizas y de plantas de ornato (Pasupuleti y Demain, 2010).

Amaranto como fuente de herbicidas

El amaranto es una hierba ampliamente distribuida por las regiones tropicales y templadas del mundo, comprendiendo 386 especies; en México algunas especies del amaranto son usadas como alimento, esto debido al alto contenido de proteína en sus granos y a su calidad nutritiva, de las especies de amaranto *Amaranthus hypocondriacus* es la especie más importante y consumida como alimento (Tejeda-Sartorius y Rodríguez-González, 2008).

Se ha observado que las proteínas encontradas en las semillas de amaranto tienen una gran variedad de propiedades fisicoquímicas y estructurales (Scilingo *et al.*, 2002), encontrándose albúminas, globulinas y glutelinas en mayor proporción (Martínez y Añón, 1996), debido a la diversidad de propiedades exhibidas por estas proteínas es posible encontrar una amplia gama de funciones, incluyendo aplicaciones en el área agrícola.

Aunado a esto, el amaranto ha demostrado poseer propiedades que permiten el control de malezas; siendo estudiado el efecto inhibitorio de sus residuos como una posible acción alelopática, demostrándose una actividad inhibitoria en el crecimiento de radícula de malezas como *Echinochloa cruz-galli* y en hortalizas como rábano, cebolla y zanahoria (Tejeda-Sartorius y Rodríguez-González, 2008).

3. Planteamiento de problema

Debido a la constante presión selectiva a la que se enfrentan las malezas, el incremento de biotipos resistentes a herbicidas es cada vez mayor; esto debido al empleo poco racional de los herbicidas ya existentes y a la falta de desarrollo e investigación de nuevos compuestos que tengan como objetivo modos de acción alternativos a los ya descritos sin descuidar la problemática ambiental y de salud.

Para esto, el empleo de sustancias de origen natural es una alternativa que ha demostrado proveer resultados prometedores en el área agroquímica, siendo de interés las sustancias de origen proteico existentes en la semilla de amaranto debido a su fácil obtención y a su gran proporción dentro de la biomasa de la misma.

4. Objetivos

Objetivo general

Realizar el aislamiento biodirigido y la evaluación fitotóxica de compuestos de origen proteico con efecto herbicida extraídos de semilla de amaranto.

Objetivos específicos

1. Realizar la extracción de las proteínas existentes en la semilla de amaranto.
2. Evaluar la actividad herbicida del extracto proteico usando semillas de lechuga como modelo de estudio y empleando germinación en medio sólido estéril.
3. Aislar el compuesto proteico responsable de la actividad herbicida mediante separación guiada por bioensayo.
4. Realizar la caracterización espectroscópica, determinar punto isoeléctrico y la secuencia de aminoácidos del compuesto de interés.
5. Evaluar la fitotoxicidad del compuesto aislado en diferentes plantas identificadas como maleza.

5. Hipótesis

El género *Amaranthus* sp. es conocido por su gran resistencia a condiciones bióticas y abióticas desfavorables, por lo tanto es de esperar que como mecanismo de supervivencia sus semillas posean sustancias que disminuyan la viabilidad de otras plantas a su alrededor; es sabido que entre el género *Amaranthus* sp. las semillas de la especie *Amaranthus hypocondriacus* son las que presentan una mayor cantidad de proteínas, por lo tanto se espera aislar, purificar y caracterizar compuestos proteicos con actividad herbicida de ésta planta.

6. Metodología

Esquema de purificación

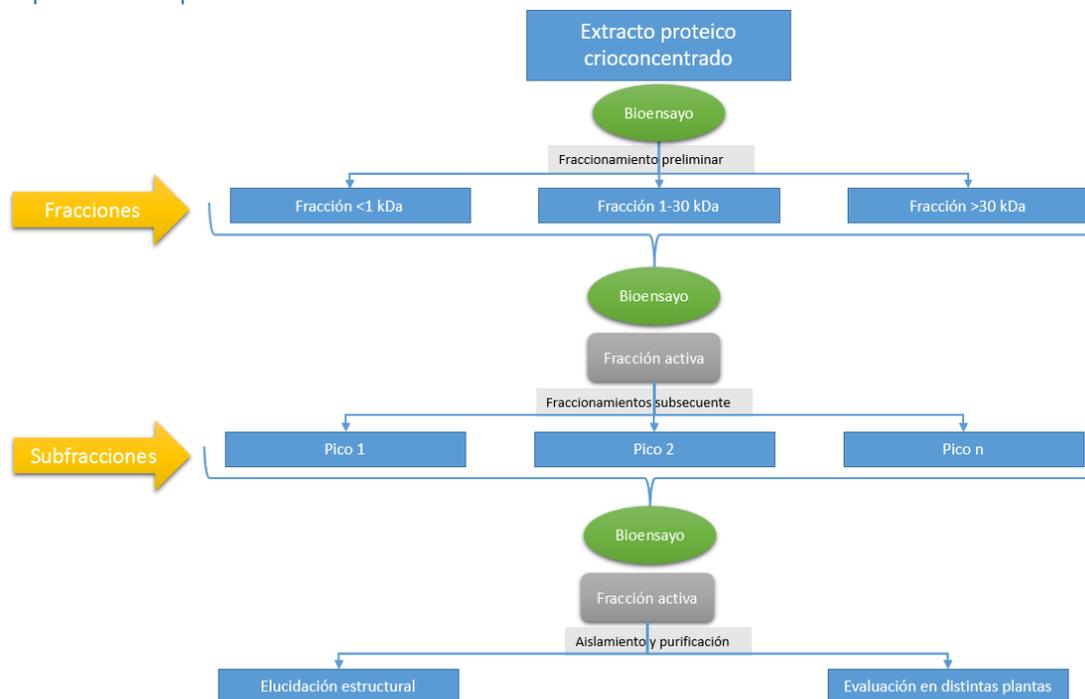


Figura 11. Esquema general de purificación guiada por bioensayo.

Extracción proteica y crioconcentración.

Una vez que las semillas fueron reventadas con calor seco, las proteínas solubles en agua a pH neutro se extrajeron; posteriormente el residuo se filtró y se secó a vacío, el residuo seco se desengrasó bajo agitación durante 30 min a 4°C con hexano en una proporción de 5mL de hexano por cada gramo de residuo, el residuo sólido se filtró y se secó a vacío.

Para extraer los remanentes proteicos no solubles a pH neutro, el residuo seco y desengrasado se extrajo con agitación durante 4 h a 4°C con buffer de acetato de amonio 50 mM a pH 9 en una proporción de 10 mL de buffer por cada gramo de residuo, se centrifugó a 3400 G por 20 min y se colectó el sobrenadante.

El proceso de crioconcentración se basó en un método desarrollado que emplea el dispositivo mostrado en la figura 12, el líquido permeado se colectó para su posterior purificación (Virgen-Ortiz *et al.*, 2012).

METODOLOGÍA

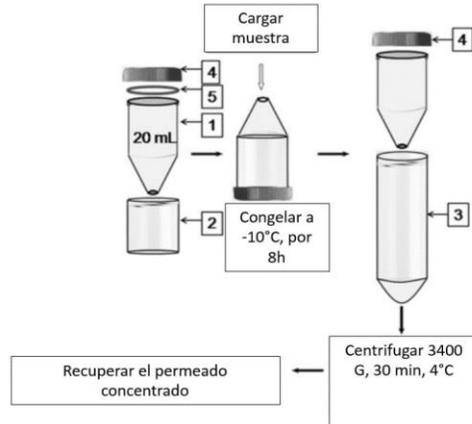


Figura 12. Material usado para crioconcentración. Tomado y modificado de (Virgen-Ortíz *et al.*, 2012).

Separación por ultrafiltración

El extracto proteico concentrado se fraccionó mediante ultrafiltración empleando dos membranas de ultrafiltración (MILLIPORE de celulosa regenerada consecutivas) con valor de corte de peso molecular de 30 kDa y 1 kDa de forma secuencial, obteniéndose tres fracciones, siendo nombrada como UF1 la fracción con especies de > 30 kDa, UF2 la fracción con especies de 1-30 kDa y UF3 la fracción con <1 kDa.

Separación por cromatografía de exclusión molecular

La fracción con mejor actividad se separó mediante exclusión molecular empleando una columna Sephacryl 100-HR con rango de separación de 1-100 kDa empacada en una columna de 100 x 1 cm empleando como fase móvil buffer acetato de amonio 50 mM a pH 9 con un flujo de 1mL/min a temperatura ambiente; se inyectó 2mL de muestra, para posteriormente coleccionar los picos leídos a una absorbancia de 280nm.

Equipo: Cromatógrafo de baja resolución Pharmacia Biotech Gradifrac System HiLoad Pump P-50.

Determinación de volumen total de separación y volumen muerto

Se preparó una solución de azul dextran 2000 y acetona en concentración de 5 y 2 mg/mL, se inyectó por duplicado 1mL de la mezcla y se coleccionaron fracciones de 2mL (GE Healthcare, 2012).

La altura de plato teórico de la columna se calculó mediante la ecuación 1.

Ecuación 1. Altura de plato teórico.

$$\frac{N}{m} = \frac{5.54(Ve/w)^2}{L}$$

Donde V_e es el volumen de elución tomado en el punto máximo del pico cromatográfico (en mL), w es el ancho de pico a la mitad de la altura del pico (en mL), L es la longitud de la columna (en m). El volumen de separación se calculó mediante la resta de $V_t - V_o$.

Calibración de columna de exclusión molecular

Se preparó una solución de ácido tocinoico (740.8 Da), ribonucleasa A (13 700 Da) y anhidrasa carbónica (29 000 Da), cada uno en una concentración de 3 mg/mL en buffer de acetato de amonio pH 9.50mM, se inyectó por duplicado 1mL de la mezcla de proteína y se colectaron fracciones de 2mL.

Se elaboró la curva de calibración graficando el coeficiente de distribución (Kd) contra $\log_{10}R$; Kd se puede calcular mediante la ecuación 2.

Ecuación 2. Coeficiente de distribución.

$$Kd = \frac{(Vr - Vo)}{(Vt - Vo)}$$

Donde Vr es el volumen de elución del pico correspondiente, Vo es el volumen muerto de la columna y Vt es el volumen líquido total de la columna.

Separación por cromatografía de fase reversa

La fracción obtenida por exclusión molecular que demostró mejor actividad se purificó por HPLC fase reversa, empleando una columna Kromasil Akzo Nobel Global C18 con una dimensión 150 x 4.6 mm y un tamaño de partícula 5 μ m, usando el gradiente mostrado en la Cuadro 5 empleando como fase móvil A: H₂O (TFA 0.1%) y B: ACN (TFA 0.1%) a un flujo de 1 mL/min en una temperatura 25°C inyectando 50 μ L de muestra, los picos se colectaron después de detectarlos a una absorbancia de 220 y 280 nm.

El equipo empleado fue un cromatógrafo Shimadzu Prominence UFLC System, provisto de detector UV/VIS modelo SPD-20A, automuestreador SIL-20A, bomba LC-20AT y horno de columna CTO-10AS VP.

Cuadro 5. Gradiente empleado para la purificación por HPLC del pico de interés.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0-5	100	0
5-40	100-0	0-100
40-55	0	100

Electroforesis en gel SDS-PAGE

La separación se realizó en geles de poliacrilamida de 0.75 mm de espesor, los cuales constan de gel concentrador al 4 % de aproximadamente 2 cm donde se cargan las muestras y gel separador al 12% de aproximadamente 6 cm, los geles se prepararon a partir de las siguientes soluciones y reactivos.

Cuadro 6. Cantidades necesarias para la preparación de 2 geles de electroforesis.

	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4%)
Agua	3.25 mL	3.05 mL
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 mL	--
SDS 10%	100 µL	50 µL
Tris 0.5M pH 6.8		1.25 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (30%:0.8%)	4.08 mL	0.65 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL	60 µL
TEMED	5 µL	6 µL

El buffer de corrida constó de dodecilsulfato de sodio al 0.1%, glicina 192 mM y Tris-HCl 25 mM a pH 8.3 y el buffer de carga 125 mM Tris-HCl a pH 6.8, glicerol al 20%, SDS al 1% y 0.05% de azul de bromofenol (Scilingo *et al.*, 2002). Se cargaron alrededor de 10 µg de proteína y se aplicó una corriente de 110V, se usó una mezcla de estándares de peso molecular de 2-250 kDa Precision Plus Protein™ de BIO-RAD™ y se tiñó con azul brillante de Coomassie.

MALDI-ToF-MS

Se realizó una solución alrededor de 20 pM en agua:acetonitrilo (1:1), se mezcló con una matriz ácido sinapínico en una proporción 1:5 y se analizó en un espectrómetro de masas MALDI-ToF Bruker Daltonics flexAnalysis (Carresi *et al.*, 2006; Hçfner, 2007).

Cuantificación de proteína por BCA en microplaca.

Preparación de reactivo A: Se preparó una solución de 1 g bicinconinato sódico, 2 g de Na₂CO₃, 0.16 g de tartrato de sodio, 0.4 g de NaOH se llevó a H₂O y se ajustó a pH 11.25 con NaOH.

Preparación de reactivo B: Se preparó una solución de 0.4g de CuSO₄.5H₂O en 10 mL de H₂O

Reactivo de trabajo: Se preparó una mezcla de reactivo A: reactivo B (100:2).

Ensayo en microplaca: Se mezcló 200 µL de reactivo de trabajo y 25 µL de solución problema e incubó a 60°C por 30 min, se estabilizó a temperatura ambiente y midió absorbancia a 562 nm.

Se comparó contra una curva estándar concentraciones de 5 a 250 µg/mL de albumina sérica bovina (Thermo Scientific, 2010; Smith *et al.*, 1985).

Preparación de agar Murashige-Skoog.

Se adicionó 4.4 g de medio Murashige-Skoog y 16 g de sacarosa a 500 mL de agua destilada, se ajustó con KOH a pH 7.00 ± 0.05, se agregó 6 g de agar bacteriológico se calentó hasta disolver, posteriormente se llevó a 1000mL con agua destilada, y se esterilizó con calor húmedo a 120°C por 15 min (Smith y Heese, 2014).

Bioensayo inhibición de crecimiento de radícula.

En una caja Petri de 100 x 15 mm se agregó 9 mL de agar M-S; una vez que el medio haya solidificado se agregó 1 mL de solución de prueba cubriendo toda la superficie del medio, se permitió la difusión toda la noche a temperatura ambiente (Macías *et al.*, 2000; Di Salvatore *et al.*, 2008).

Se sembraron por triplicado 10 semillas de lechuga Grandes lagos 118 (Rancho los molinos) previamente esterilizadas superficialmente (1 min en etanol al 70% y 15 min en NaClO al 1.5%) por cada grado de concentración a probar, se selló y se incubó en oscuridad a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 días (2 días de germinación, 2 días de crecimiento de radícula).

El porcentaje de inhibición de crecimiento de radícula se calculó empleando la ecuación 3.

Ecuación 3. Calculo de porcentaje de inhibición.

$$\%Inhibición = \frac{\text{longitud control} - \text{longitud tratamiento}}{\text{Longitud de control}} \times 100 \text{ (Yang \& Lu 2010)}$$

Bioensayo de crecimiento de raíz en medio líquido

Las raíces se obtuvieron mediante germinación de las semillas mostradas en el cuadro 7 previamente esterilizadas superficialmente (etanol al 70% por 1 min e hipoclorito de sodio al 5% por 15 min), empleando papel filtro, cajas Petri de 100 x 15 mm y 2 mL de medio salino basal de White (Buchner *et al.*, 1989).

Cuadro 7. Semillas empleadas para bioensayo de crecimiento de raíz.

Semilla	Origen
<i>Ageratum corymbosum</i> Zucc.	Muestreo 19/05/2014
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Muestreo 19/05/2014
<i>Bidens odorata</i> Cav.	Muestreo 19/05/2014
<i>Cuscuta</i> sp.	Muestreo 19/05/2014
<i>Parthenium bipinnatifidum</i> (Ortega)	Muestreo 19/05/2014
<i>Lactuca sativa</i> var. Grandes lagos 118	Rancho Los molinos
<i>Solanum lycopersicum</i> var. Rio grande	Hydroenvironment
<i>Sorghum bicolor</i> var. Silage naranja	Hydroenvironment
<i>Zea mays</i> maíz amarillo var. Tiburón plano medio	Hydroenvironment

Después de 7 días de germinación a cada plántula de cada especie se le cortó 0.5 cm de la región apical de la raíz, para cada bioensayo se emplearon 30 cortes.

En tubos de ensayo de 15 mL se agregó 2 mL de solución de prueba previamente esterilizada por filtración (solución de péptido en medio basal White 0.75 mg/mL, control negativo medio basal de White a pH 5.7 y control positivo solución de herbicida Atrazina/S-metolaclor 10^{-2} M).

Por cada tubo se colocaron 10 cortes de raíz, una vez introducidos en el medio se incubaron por 48 h a una agitación de 200 rpm y una temperatura de 20°C , todo esto en condiciones de oscuridad, posteriormente se midió el crecimiento (Buchner *et al.*, 1989; Nachmias *et al.*, 1987).

Bioensayo en disco de hoja

Todas las plantas empleadas en este bioensayo (cuadro 7) fueron cultivadas a una temperatura de 21 °C, condiciones de luz/oscuridad 12/12 h, en sustrato inerte de tezontle y regadas con medio basal White, con el fin de evitar crecimiento heterogéneo debido a la naturaleza del sustrato de crecimiento.

El ensayo se realizó en 10 hojas verdaderas de plantas con una edad de 8 semanas; se esterilizaron superficialmente (etanol al 70% por 1 min y con solución de hipoclorito de sodio al 5% por 3 min), se colocaron con el haz hacia abajo en una caja Petri de 55 mm con solución de prueba, se incubó por 24h en condiciones de 12/12h luz/oscuridad.



Figura 13. Exposición de la hoja a la solución de prueba.

Después de las 24 h, a cada hoja tratada se le cortó un disco de 5mm de diámetro con una perforadora metálica previamente esterilizada y se colocó en agar White + almidón, para monitorear su viabilidad (Cruz-Cruz *et al.*, 2009; González *et al.*, 2012).

La solución de péptido en medio basal White se realizó en concentración de 0.75 mg/mL comparando con un control negativo de medio basal de White a pH 5.7 y con un control positivo de una mezcla de herbicida Atrazina/S-metolaclor 10^{-2} M.

Determinación de viabilidad celular mediante monitoreo de actividad alfa-amilasa.

Después de realizar el tratamiento descrito en la sección anterior, se colocaron 5 secciones de 5 mm de tejido respectivo a cada planta probada en cajas Petri de 9 mm de diámetro con agar basal White adicionado con almidón en una concentración de 1 g/L (Figura 14). Al cabo de 48 h se retiró el tejido y se colocó en el agar 3mL de solución de reveladora de yodo al 10%, se incubó 5 min a 25°C y se midió el halo de hidrólisis de almidón (González *et al.*, 2012).

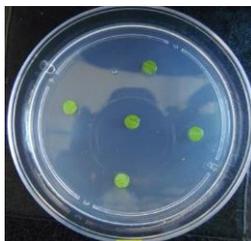


Figura 14. Ejemplo de distribución de disco de hoja en agar basal White.

Detección de H₂O₂ mediante tinción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en hoja.

Después de realizar el tratamiento en las hojas, se cortaron discos de 5 mm, inmediatamente se colocaron en 2 mL de una solución de DAB en 1 mg/mL y Tween 20 al 0.05% v/v en solución de NaH₂PO₄ 10 mM, cubriendo por completo los segmentos de las hojas.

Posteriormente en condiciones de oscuridad se infiltró al vacío por 30 minutos y se dejó incubando a temperatura ambiente toda la noche. Una vez terminado el periodo de incubación se retiró la solución de tinción de DAB y se agregó la solución blanqueadora (Etanol: ácido acético: glicerol 3:1:1) hasta cubrir las hojas. Se incubó a 70°C por un periodo de 1 a 2 horas hasta que la hoja quedó completamente despigmentada. Se retiró la solución de blanqueo y se realizó un lavado con etanol al 50 %, y otro lavado más con agua destilada. Finalmente se agregó la solución de preservación (glicerol: etanol 1:4) y se observaron las muestras en el microscopio óptico (Daudi y O'Brien, 2012).

Bioensayo de infiltración en hoja en *Arabidopsis thaliana*

Las plantas *Arabidopsis thaliana* Col-0 fueron cultivadas a una temperatura de 21 °C, condiciones de luz/oscuridad 12/12 h, en sustrato inerte de tezontle y regadas con medio basal White, con el fin de evitar crecimiento heterogéneo debido a la naturaleza del sustrato de crecimiento

El ensayo se realizó en plantas con al menos un par de hojas verdaderas con una edad de 4-8 semanas, la aplicación de solución de compuesto se realizó en concentraciones de 1540, 154 y 15.4 µg/mL siendo infiltrados 100 µL de solución de prueba, comparando con un blanco de buffer de acetato de amonio 50 mM pH 5.7, las hojas fueron puestas en condiciones de luz 12/12 y fueron monitoreadas a las 48 h, 4 semanas y 6 semanas observando la cantidad de clorosis o necrosis exhibida alrededor de la zona de infiltración (Nachmias *et al.*, 1987; Buchner *et al.*, 1989).

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, las diferencias significativas de los tratamientos se determinaron mediante ANOVA de un factor, tomándose en cuenta un valor $p \leq 0.01$. En las determinaciones en las que fue necesario hacer comparaciones múltiples de medias, se empleó el test post-hoc de Tamhane empleando un valor $p \leq 0.01$. Se empleó el programa de análisis estadístico IBM SPSS Statistics 22.

7. Resultados y discusión

Calibración de columna de exclusión molecular

La calibración de la columna de exclusión molecular permitió la resolución de proteínas de 0.7, 13.7 y 29 kDa.

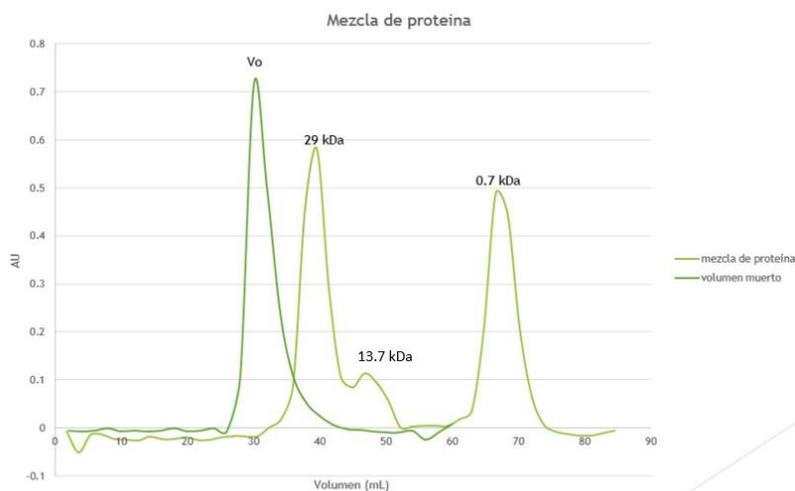


Figura 15. Cromatograma de exclusión molecular de marcadores de peso molecular 29, 13.7 y 0.7 kDa. Columna: Sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 x 1 cm 50 μ m; fase móvil: buffer acetato de amonio pH 9, 50 mM; flujo: 1 mL/min; temp: ambiente; vol. de inyección de 2 mL; detector: UV 280nm.

Como se puede observar en la Figura 15 la columna es capaz de separar mezclas de proteínas con un tamaño de 29 y 0.7 kDa o 13.7 y 0.7 kDa sin problemas de resolución; sin embargo, proteínas con tamaños más cercanos como 29 y 13.7 no pueden ser completamente resueltos por esta columna, por lo que se empleó solamente para una separación preliminar, donde a la vez de separar por tamaño, se pudiera hacer una inferencia primaria acerca del intervalo de tamaño de la especie proteica que presenta actividad.

El Cuadro 8 presenta los parámetros cromatográficos promedio de tres inyecciones de ácido tocinoico, correspondiente al compuesto con mayor retención; como se puede observar en la tabla la eficiencia de la columna es suficientemente buena para columnas preparativas de exclusión molecular no pre-empacadas (GE Healthcare, 2012).

Cuadro 8. Parámetros cromatográficos para columna sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 X 1 cm

Parámetro	Altura de plato teórico	Volumen de separación
Media	888.10	35.87
C.V.	9.48%	2.25%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 16 muestra el gráfico de correlación del coeficiente de distribución con respecto al logaritmo del radio hidrodinámico de los compuestos, se puede observar que para los tres puntos correspondientes a las proteínas de 29, 13.7 y 0.7 KDa el factor de correlación es de 0.996, por lo que es posible emplear esta ecuación de correlación para conocer el rango de tamaños de las proteínas que se separen con ésta columna.

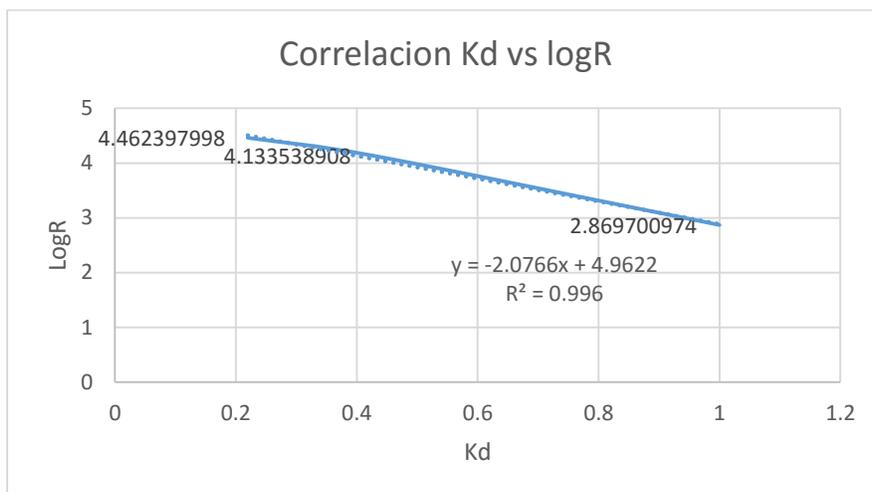


Figura 16. Gráfico de correlación de Kd respecto al $\log_{10}R$.

El cuadro 9 muestra la obtención de los parámetros necesarios para construir la curva de calibración mostrada en la figura 16, siendo los volúmenes de elución los únicos datos obtenidos experimentalmente.

Cuadro 9. Parámetros calculados para la elaboración de la curva de correlación Kd vs. $\log R$.

Compuesto	$Kd=(v_r-v_o)/(v_t-v_o)$	Vol	R	log R
Ac. tocinoico	1	66.6	740.8	2.8697
Ribonucleasa	0.42774566	46.8	13600	4.1335
Anhidrasa carbónica	0.21965318	39.6	29000	4.4623

Bioensayo con extracto proteico total

Después de extraer, crioconcentrar y cuantificar las proteínas totales, se realizaron cuatro diluciones 1/10 consecutivamente y se probaron en bioensayo agar Murashige-Skoog con semillas de lechuga.

La figura 17 muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE del extracto total proteico, se puede observar la presencia de componentes proteicos menores a 75 kDa, un par de bandas con gran concentración de proteínas entre 37 y 25 kDa, otro par de bandas alrededor de 20 kDa y péptidos menores a 15 kDa, éste gel muestra la gran variedad proteica presente en la muestra. Al observar la figura 18 se puede notar una gran cantidad de péptidos menores a 13.7 kDa agrupados en tres picos cromatográficos, y un par de picos mayores a 29 kDa, la diferencia en distribución de tamaños se debe al carácter de la muestra durante la separación y al tipo de separación cromatográfica; en la electroforesis SDS-PAGE la muestra se encuentra reducida y desnaturalizada, mientras que en la cromatografía por exclusión molecular, las proteínas de la muestra se encuentran en estado nativo, por lo que es más probable encontrar agregados, que son explicados por el pico encontrado antes del volumen muerto.

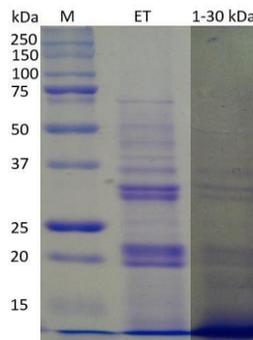


Figura 17. Gel de electroforesis de fracción de 1 a 30 kDa (1-30 kDa) y extracto total (ET).

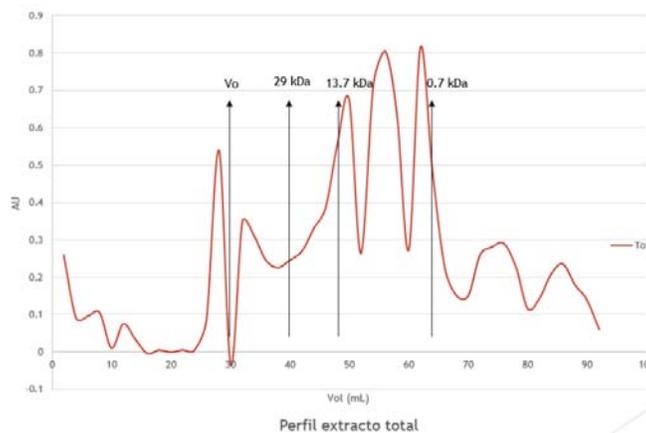


Figura 18. Cromatograma de exclusión molecular de extracto total proteico crioconcentrado. Columna: sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 x 1 cm 50 μ m; fase móvil: buffer acetato de amonio pH 9 50 mM; flujo: 1 mL/min; temp: ambiente; vol iny: 2 mL; detector: UV 280 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 19 muestra el espectro MALDI-ToF del extracto total proteico, dando como resultado una gran cantidad de señales correspondientes a moléculas menores a 9 kDa, siendo bastante congruente con los resultados obtenidos en electroforesis SDS-PAGE y por cromatografía de exclusión molecular, gracias a este espectro se puede conocer la gran complejidad de la muestra en cuanto a compuestos peptídicos.

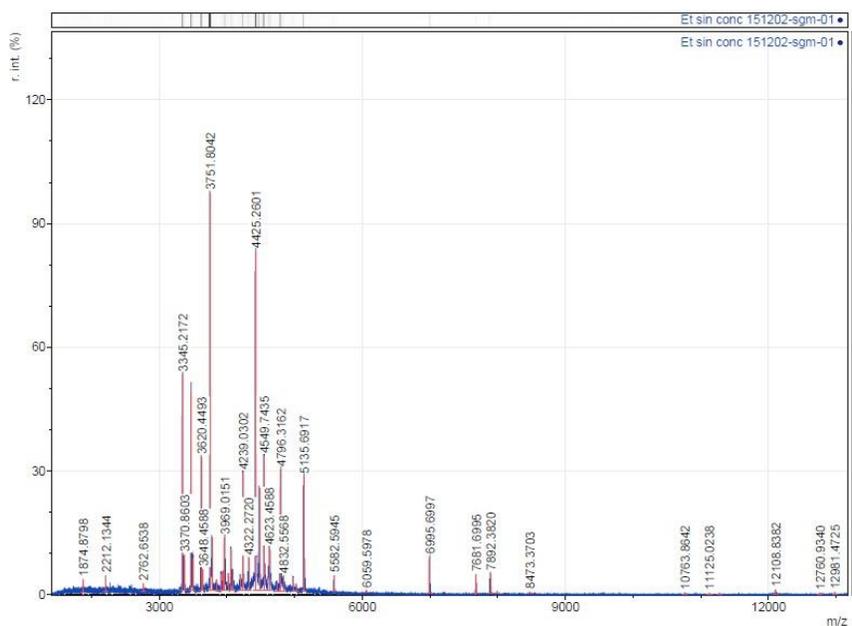


Figura 19. Espectro MALDI-TOF obtenido del extracto total proteico sin crioconcentrar.

Al realizar el bioensayo de inhibición de crecimiento de raíz con las concentraciones de 1500, 150, 15 y 1.5 mg/mL se observó una inhibición significativamente diferente de crecimiento en todas las concentraciones probadas (Figura 20), siendo indicativo de la presencia de algún compuesto con actividad inhibitoria; éste resultado permite continuar con el fraccionamiento del extracto para comenzar el aislamiento biodirigido.

Es importante hacer notar la presencia de una gran variación en los resultados, esto es debido a la variación intrínseca en cuanto a los tiempos de germinación de las semillas; sin embargo, a pesar de que los tiempos de germinación no son uniformes, la presencia de inhibición es una pauta a seguir para comenzar con el aislamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

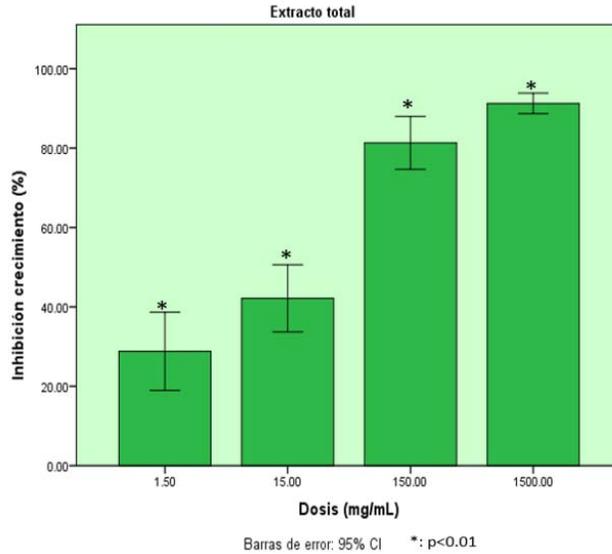


Figura 20. Inhibición de germinación a diferentes concentraciones de extracto total de proteínas, realizado con 30 semillas de *Lactuca sativa*, (*) representa una diferencia significativa con $p < 0.01$.

Bioensayo de fracciones primarias por ultrafiltración.

Después de crioconcentrar se cuantificaron las fracciones y se homologaron las concentraciones a 77.7 mg/mL de cada fracción liofilizada y se realizaron cuatro diluciones seriadas 1/10.

Como se puede observar en la figura 21, se encontró que la mejor actividad inhibitoria es causada por la fracción de 1 – 30 kDa, observándose una diferencia significativa en la inhibición del crecimiento radicular en tres de las 4 concentraciones probadas, al encontrarse la mejor actividad en ésta fracción se puede descartar la acción fitotóxica de compuestos menores a 1 kDa, lo cual es apoyado por los resultados mostrados en la figura 22, donde se muestra un pico cromatográfico muy grande correspondiente a compuestos de alrededor de a 0.7 kDa.

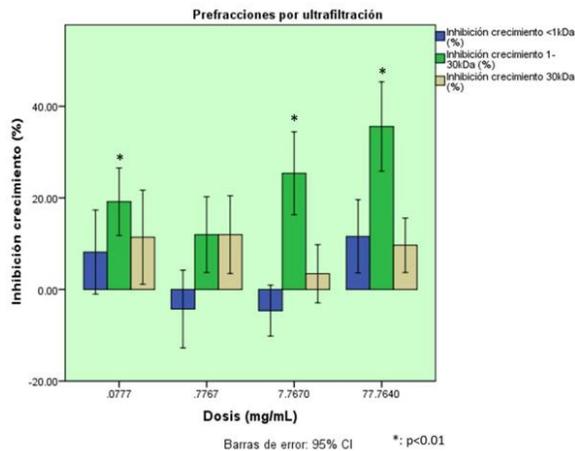


Figura 21. Gráfico de inhibición de germinación a diferentes dosis de correspondiente a las fracciones < 1kDa (azul), 1 -30 kDa (verde) y > 30 kDa (gris), realizado con 30 semillas de *Lactuca sativa*, (*) representa una diferencia significativa con $p < 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

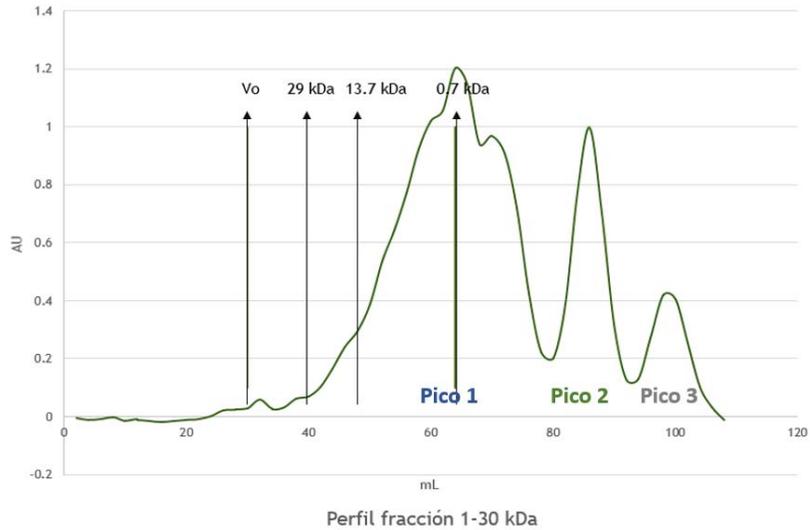


Figura 22. Cromatograma de exclusión molecular de la prefracción de 1 – 30 kDa. Columna: sephacryl S-100 HR (1-100 kDa) 100 x 1 cm 50 μ m; fase móvil: buffer acetato de amonio pH 9 50 mM; flujo: 1mL/min; temp: ambiente; vol iny: 2 mL; detector: UV 280 nm.

En la figura 22 se puede observar la presencia de dos picos retenidos después del límite de separación dado para ésta columna cromatográfica, esto indica una interacción debida a un mecanismo diferente al de la permeación en gel; a pesar de tratarse de picos retenidos debido a un mecanismo distinto a la exclusión molecular, se observó una buena resolución y una excelente repetibilidad, por lo que los picos obtenidos después del volumen total fueron conservados y empleados para los bioensayos.

La figura 23 muestra el espectro de masas MALDI-ToF lográndose observar señales correspondientes a compuestos menores de 9 kDa, lo que muestra que ésta fracción proveniente de ultrafiltración presenta una gran cantidad de péptidos, probables responsables de la actividad fitotóxica de ésta fracción.

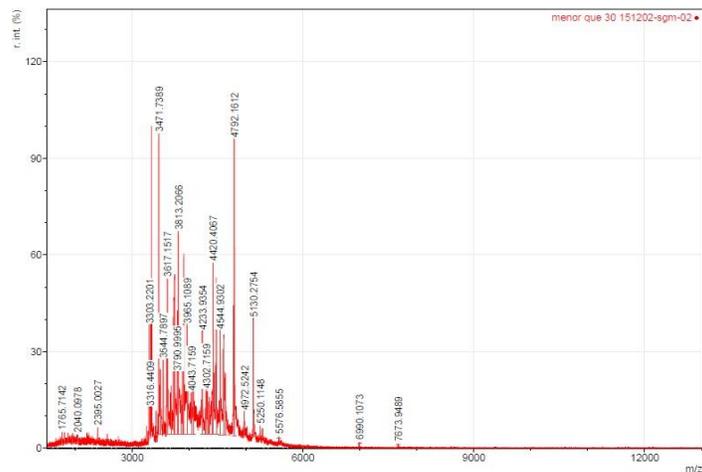


Figura 23. Espectro MALDI-ToF obtenido de la prefracción de 1 – 30 kDa.

Bioensayo de fracciones secundarias obtenidas por exclusión molecular

La fracción con mejor actividad (1-30 kDa) se separó por cromatografía de exclusión molecular y se obtuvieron tres fracciones correspondientes a cada pico.

Al realizarse bioensayo se encontró una inhibición significativamente diferente en la concentración de 0.35 mg/mL del pico 2 con una inhibición del 100% y para el pico 3 en su concentración 0.08 mg/mL con una inhibición poco mayor al 60%; en el momento de hacerse la elección del pico de interés se optó por seleccionar el pico 3 ya que a pesar de no tener una actividad tan buena como la que presentó el pico 2, presenta una inhibición mayor al 50% en una concentración 10 veces menor a la presentada por el pico 2, por lo que se puede inferir una mejor actividad por parte de éste pico.

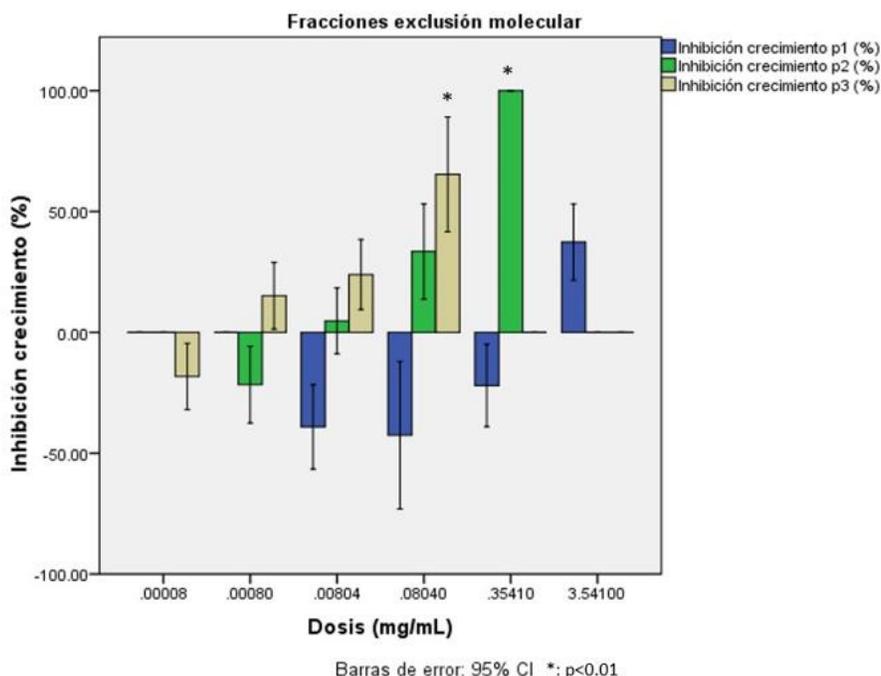


Figura 24. Gráfica de inhibición de germinación a diferentes dosis de correspondiente a los picos obtenidos por exclusión molecular: Pico 1 (azul), Pico 2 (verde) y Pico 3 (gris) realizado con 30 semillas de *Lactuca sativa*, (*) representa una diferencia significativa con $p < 0.01$.

Como se logra observar en la figura 23, las barras de error son muy grandes, esto se debe a la gran variabilidad en cuanto a los tiempos de germinación de la planta de prueba, esto ocasiona una gran dispersión de los datos obtenidos; sin embargo, los resultados mostrados permiten observar una tendencia en cuanto al comportamiento del crecimiento radicular de las plantas, lo que permitió tomar la decisión de elegir el pico 3 para las futuras pruebas y purificaciones.

El espectro de masas MALDI-ToF mostrado en la figura 25 hace notar la naturaleza de la mezcla presente en el pico seleccionado donde se observan compuestos de los siguientes pesos moleculares: m/z 3911 $[M + H]^+$ ($3934 [M + Na]^+$), y m/z : 3955, 4119 y 4136 con una abundancia relativa muy baja (Tabla 11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

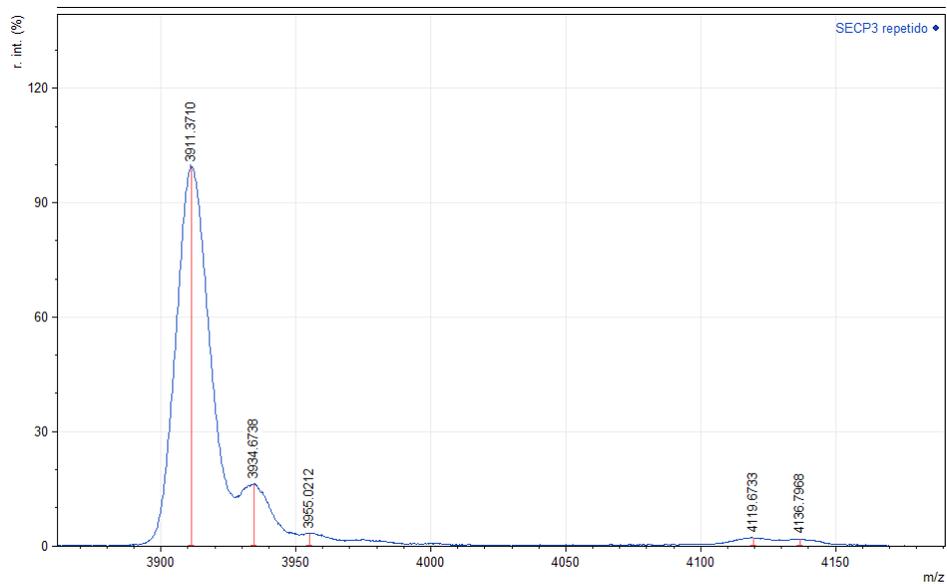


Figura 25. Espectro MALDI-TOF obtenido del pico 3 de la fracción 1 – 30 kDa.

Como es posible observar en el cuadro 10, la señal con m/z : 3934.67 puede tratarse de un aducto catiónico del péptido con sodio $[M + Na]^+$.

Cuadro 10. Lista de m/z e intensidad relativa para pico 3 de la fracción 1 – 30 kDa.

#	m/z	Intensidad relativa (%)
1	3911.37103885	100.0 $[M + H]^+$
2	3934.67384135	16.47 $[M + Na]^+$
3	3955.02124074	3.37
4	4119.67326984	2.10
5	4136.79683237	1.87

Purificación por HPLC

Como se muestra en la figura 26 se observa la presencia de varias especies capaces de absorber luz UV a 220nm, los picos presentes en el tiempo de retención 2.409 y 3.057 son descartados debido a su bajo factor de capacidad, lo cual indica una pobre retención y por ende una alta polaridad. De los picos restantes, el pico mayoritario correspondiente al minuto 29.906 y a 71% de disolvente orgánico fue empleado para realizar pruebas de actividad probando ser el responsable del efecto herbicida por lo que con éste se realizaron los bioensayos descritos en los apartados siguientes.

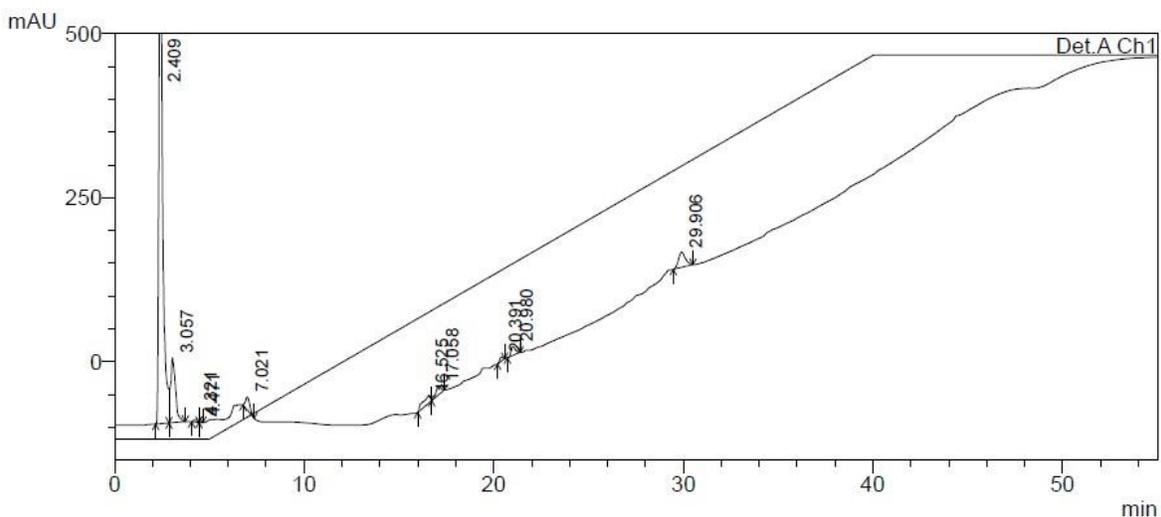


Figura 26. Cromatograma HPLC-RP del pico 3 proveniente de exclusión molecular (detector 220nm).

Como se puede observar en el cuadro 11, los picos 1 y 2 fueron desechados debido a su bajo factor de capacidad a pesar de presentar una gran área bajo la curva, al analizar las áreas de los picos restantes se logra observar que el pico 10 es el 81.65% de la suma de las áreas de los picos 3-10, lo que muestra que se trata de un compuesto mayoritario con la probable actividad fitotóxica encontrada en los bioensayos previos.

Cuadro 11. Relación de picos obtenidos en cromatografía de pico 3.

Pico	Tiempo de retención	Área	% Área	K'	%B
1	2.049	10907126*	-	0.18	0
2	3.057	1802168*	-	0.76	0
3	4.321	53045	0.74	1.48	0
4	4.471	6897	0.10	1.57	0
5	7.021	317073	4.43	3.04	6
6	16.525	372198	5.20	8.50	33
7	17.058	268835	3.76	8.80	34
8	20.391	74111	1.04	10.72	44
9	20.980	221612	3.10	11.06	46
10	29.906	5844845	81.65	16.19	71
Total		7158616	100		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizada la separación cromatográfica, se colectó el pico de interés y se comprobó su pureza por cromatografía en fase reversa, la figura 27 muestra el cromatograma del compuesto puro.

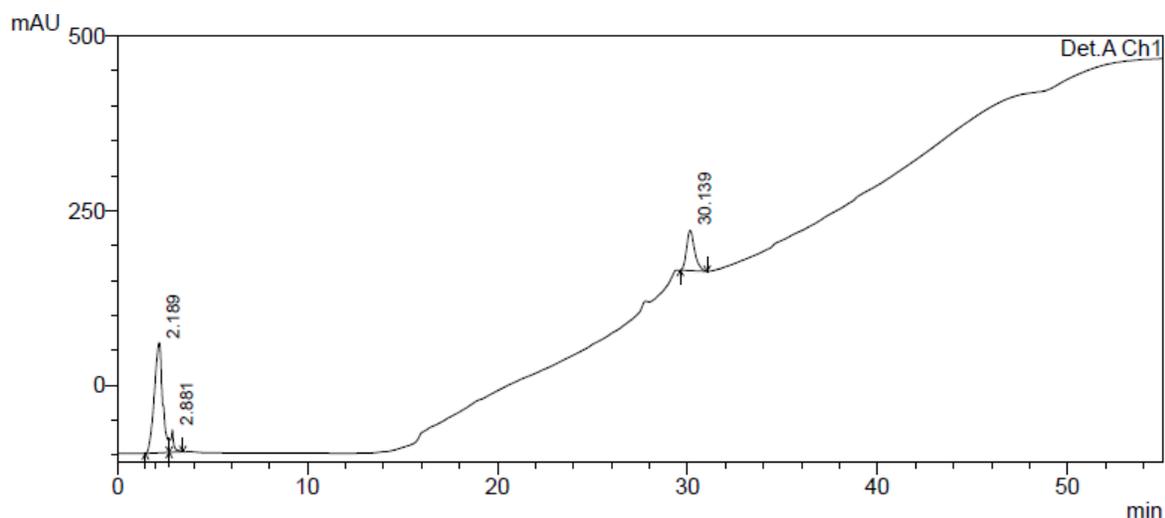


Figura 27. Cromatograma del compuesto puro (detector 220nm).

Cuadro 12. Relación de picos obtenidos en cromatografía de compuesto puro.

Pico	Tiempo de retención	Área	% Área	K'	%B
1	2.189	4788636	-	0.26	0
2	2.881	386388	-	0.66	0
3	30.139	1687549	100%	16.32	71
Total		1687549			

Como puede observarse en la figura 27, el Cromatograma presenta dos picos presentes a un tiempo de retención de 28.7 y 29.9, estos picos se observan también en el cromatograma mostrado en la figura 26; a pesar de tratarse de probables contaminantes, se observó que al inyectar únicamente fase móvil, estos picos continúan eluyendo, por lo cual fueron ignorados, al tratarse de impurezas presentes en el disolvente.

Al tomar en cuenta únicamente el pico de interés, ignorando los picos del blanco y el pico correspondiente al volumen muerto, es posible observar que la pureza de este compuesto es del 100% (cuadro 12).

Espectro de absorción UV

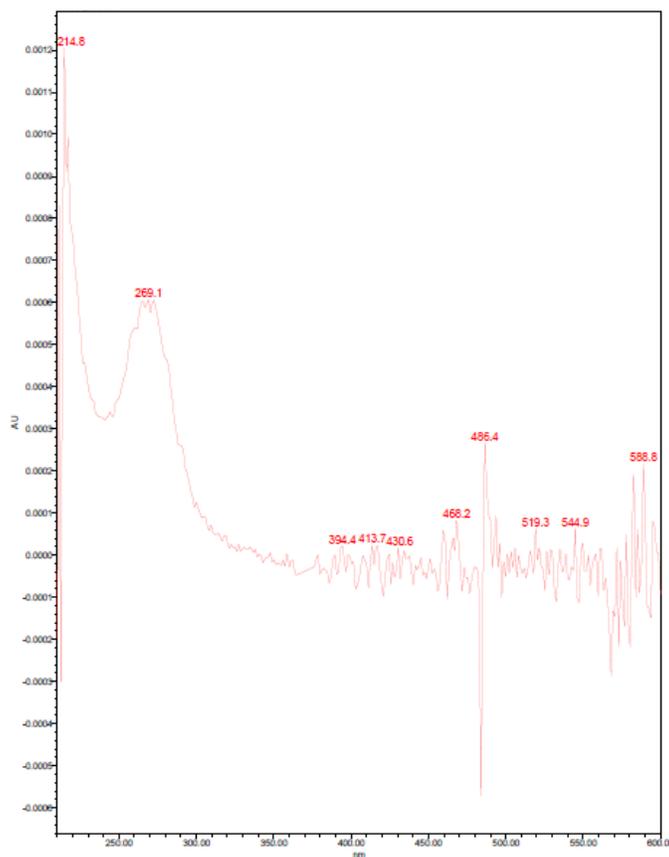


Figura 28. Espectro de absorción UV de péptido puro.

El espectro de absorción del péptido presenta máximos notorios a 214, 219 y 269 nm (Figura 28), éstos máximos se aproximan a los reportados para compuestos proteicos, correspondiendo con 220 nm para enlace peptídico y cercano a 280 nm para los grupos aromáticos presentes en el compuesto (Beaven y Holiday, 1952; Wetlaufer, 1963; Devlin, 1997).

El hecho de poseer un máximo por debajo de 280 nm puede deberse a la baja cantidad de tirosina y triptófano, los cuales presentan una gran absorción a esta longitud de onda; al existir una baja proporción de éstos aminoácidos en el péptido, el espectro puede tener un máximo diferente al clásico de 280 nm, tal como se observa en la figura 28.

Dicroísmo circular

A continuación se muestra el análisis LINCOMB (análisis de mínimos cuadrados con respecto a espectros de referencia (Perczel *et al.*, 1992)) con el programa CD analyser system 32 bit V2.02 del espectro de polarización del péptido aislado siendo comparado con espectros de referencia de hélices (1), aleatorio (2), hoja plegada (3), giro beta I (4) y contribuciones por aromáticos o puentes disulfuro (5).

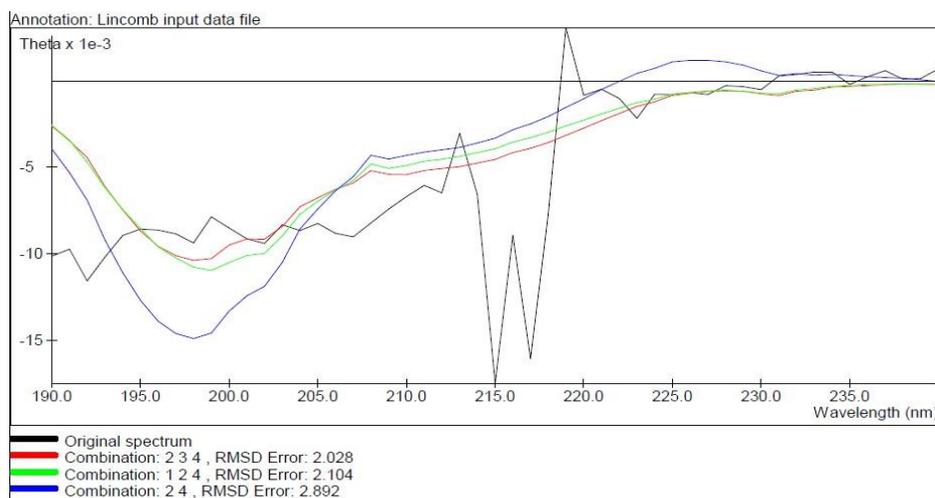


Figura 29. Espectro de dicroísmo circular de péptido 3.9 aislado por HPLC analizado con el programa CD Analyser system 32 bit V2.02.

Cuadro 13. Resultados de comparación por mínimos cuadrados.

Combinación	Error (SD)	Componentes	%
2.3.4	2.028	Aleatorio	33.08
		Hoja	14.95
		Giro beta I	51.98
1.2.4	2.104	Hélice	14.50
		Aleatorio	36.23
		Giro beta I	49.27
2.4	2.892	Aleatorio	38.17
		Giro beta I	61.83

Como se logra observar en el espectro de polarización del péptido aislado (Figura 29), se observan dos mínimos alrededor de 215 nm y un máximo en 220 nm, encontrándose igualmente una zona de elipticidad negativa por debajo de los 210 nm, por lo tanto se puede observar una mezcla de características espectrales de diferentes estructuras secundarias, gracias al análisis LINCOMB se llega a la conclusión de que éste péptido presenta una gran proporción estructural aleatoria; a su vez, los tres resultados con menor desviación estándar arrojados por el análisis espectral (Cuadro 13) muestran una gran proporción de estructura tipo giro beta I, esto proporciona indicios acerca de lo compacta que puede estar ésta cadena en el espacio, ya que es conocido que los giro beta son los giros mas pequeños posibles, constando de tan solo cuatro residuos interactuando para formar un giro sumamente compacto (Creighton, 2004).

Características estructurales.

El péptido aislado, fue analizado por espectrometría de masas en su modo de ionización por electrospray (ESI-MS), encontrándose picos a una m/z 782.93 $[M + 5]^{5+}$, 978.41 $[M + 4]^{4+}$ y 1304.21 $[M + 3]^{3+}$, realizando el análisis de deconvolución con el programa Xtract rawfile se calculó una masa monoisotópica de 3909.62 Da (Figura 30), por lo cual el pico con mayor intensidad presente en el espectro de masas mostrado en la figura 25 (3910.37 Da) es cercano al presente en el pico mayoritario encontrado en el análisis por HPLC-RP.

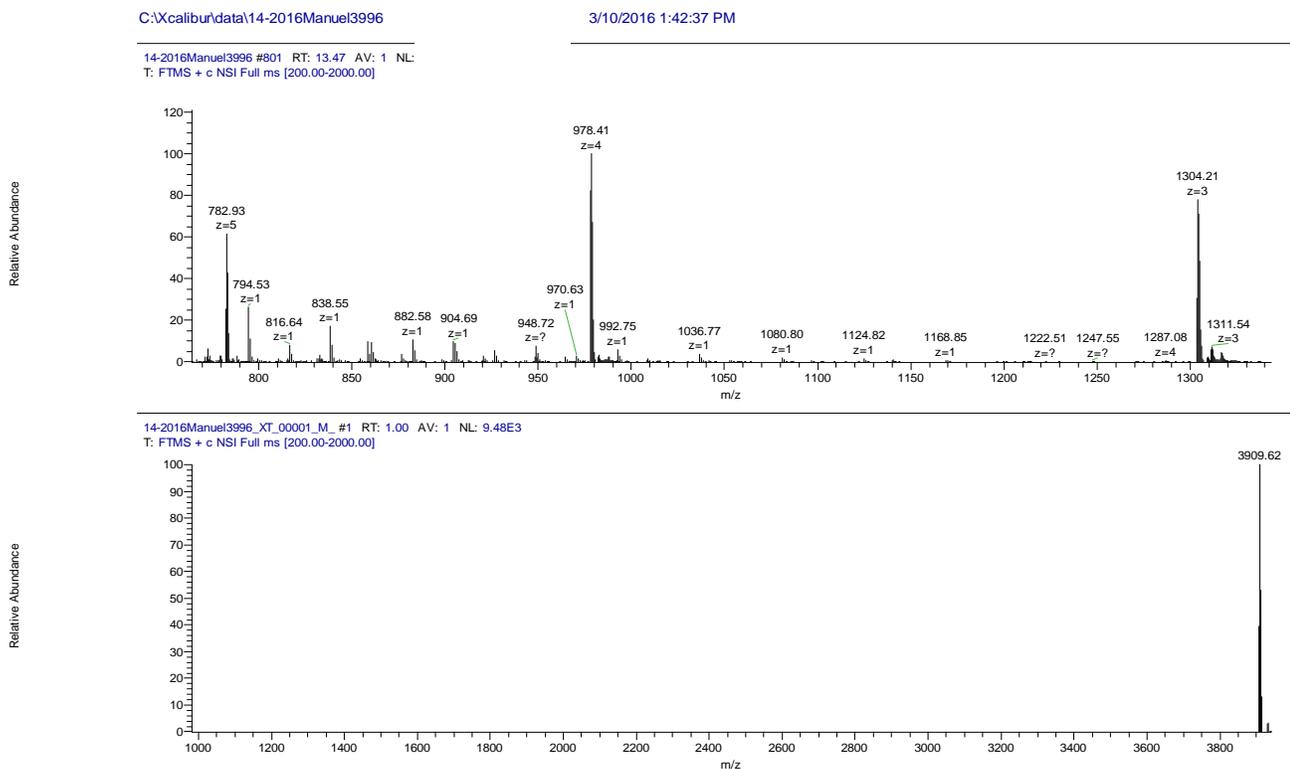


Figura 30. Espectro de masas ESI-MS del péptido aislado (arriba), deconvolución del espectro obtenido experimentalmente (abajo).

Al realizar el análisis pertinente para la secuenciación de novo reduciendo con DTT y alquilando con iodoacetamida se encontró la presencia un pico a m/z 1420.27 $[M + 3H]^{3+}$ (Figura 31), correspondiente a la masa molecular del péptido con cisteínas alquiladas, calculando la diferencia entre el péptido oxidado y alquilado se encontró la presencia de 6 cisteínas formando 3 puentes disulfuro.

$$4257.81 \text{ Da } [1420.27 \times 3 - 3H] \text{ (cisteínas alquiladas)} - 3909.62 \text{ Da (cisteínas oxidadas)} = 348.19 \text{ Da}$$

$$\text{Diferencia entre alquilación y nativa } (348.19/57 \text{ alquilación}) = 6.1$$

Estos datos respaldan la información proporcionada por dicroísmo circular, indicando que el péptido se encuentra muy compacto teniendo una gran cantidad de giros beta estabilizándose mediante puentes disulfuro.



Figura 31. Espectro de masas ESI-MS de péptido reducido y alquilado con iodoacetamida

Al digerirse con tripsina se observan los picos presentados para el péptido intacto (m/z 978 $[M + 4H]^{4+}$ y 1304 $[M + 3H]^{3+}$), (figura 32), por lo que se piensa que éste péptido no posee los aminoácidos arginina (Arg) o lisina (Lys), necesarios para crear sitios donde tripsina pueda realizar su corte.

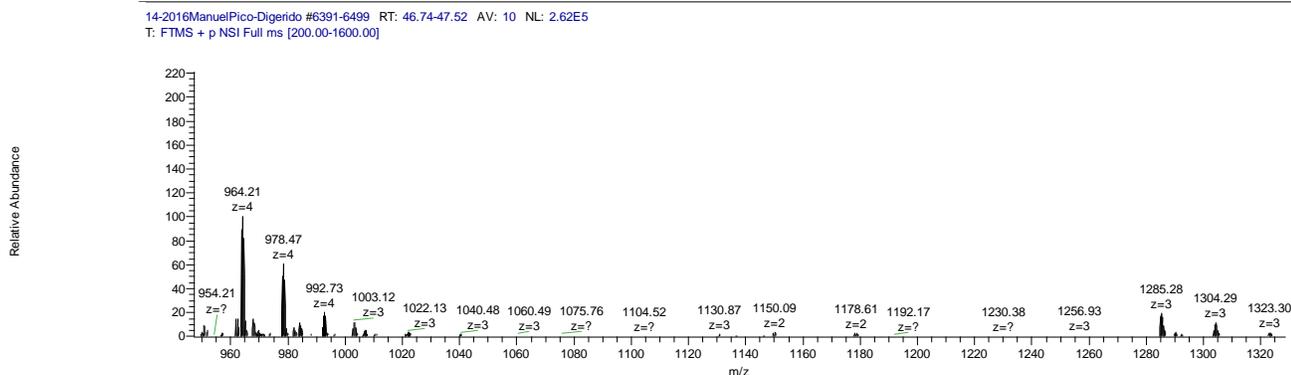


Figura 32. Espectro de masas ESI-MS de péptido digerido con tripsina.

El hecho de tratarse de un péptido proveniente de una planta con una masa de 3909.62 kDa, con tres puentes disulfuro y existente en la cáscara de la semilla, proporciona pruebas para indicar que se trata de un péptido rico en cisteínas, probablemente perteneciente a la familia de las tioninas, defensinas o péptidos tipo heveína (Price *et al.*, 2015).

Es sabido de la existencia de ciertos péptidos involucrados en la regulación del desarrollo y crecimiento vegetal, siendo conocido el factor de rápida alcalinización (RALF), la proteína de transferencia de lípidos (LTP) tipo xilógeno y la familia de proteínas estimulada por giberelina (Silverstein *et al.*, 2007; Pearce *et*

al., 2010; Kobayashi *et al.*, 2011); por lo tanto el hecho que éste péptido posea actividad herbicida no es extraño.

A su vez los péptidos con estructura similar a heveína, poseen tres o cuatro puentes disulfuro y afinidad hacia quitina (Price *et al.*, 2015); por lo tanto, gracias a estos datos es posible explicar la inusual afinidad del péptido hacia la fase estacionaria de alildextran y N,N'-metilenbisacrilamida presente en la columna de permeación en gel, ya que como se observa en la figura 33 al comparar la estructura del alildextran (polímero de glucosa) con la estructura de la quitina es posible intuir una semejanza estructural la cual podría tener cierta afinidad hacia polímeros de glucosa.

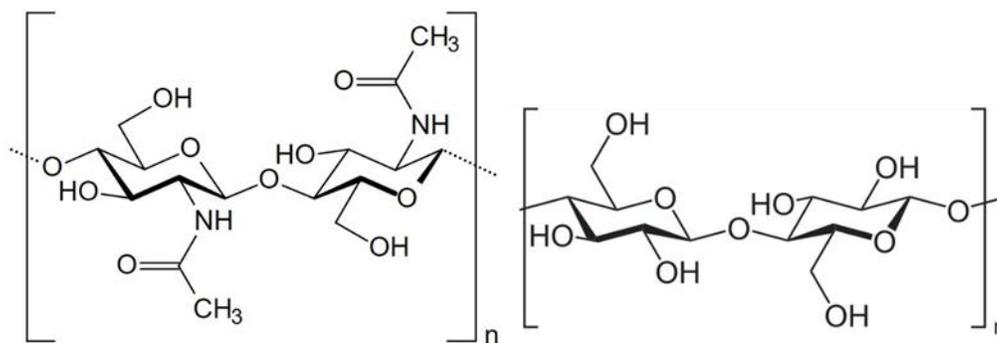


Figura 33. Estructura de monómero de quitina (izquierda) estructura de celulosa (derecha).

Rendimiento de purificación.

Por cada 500 g de semilla de amaranto, se obtuvo 56.4 mg de péptido, teniendo un rendimiento del 0.0113%.

Bioensayos realizados con compuesto puro

Una vez realizada la purificación y caracterización del péptido se logró continuar con la evaluación de su fitotoxicidad en distintas plantas, siendo necesario realizar un muestreo de malezas para lograr obtener resultados relevantes a nivel agrícola.

Para que estos ensayos fueran representativos en el uso agronómico, se realizaron con plantas cultivadas de interés agrícola y no deseables. La colecta de malezas se realizó en las parcelas existentes en la localidad de San Andrés Nicolás Bravo dentro del municipio de Malinalco, Estado de México. Obteniéndose material vegetal y semillas de las siguientes especies: *Bidens odorata* Cav., *Cuscuta* sp., *Amaranthus hybridus* L., *Ageratum corymbosum* Zucc. y *Parthenium bipinnatifidum*.

Siendo identificadas hasta género con la ayuda de la página Malezas de México de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (Vibrans, 2016) y determinada la especie en el departamento de botánica del Herbario Nacional de México (MEXU) (Ver anexo: Certificado de identificación taxonómica).

La colecta de estas plantas fue guiada por las recomendaciones de campesinos de la región, los cuales indicaron las malezas con más prevalencia en su parcela dentro y entre los ciclos agrícolas.

Todas las malezas colectadas afectan de manera directa o indirecta a una gran variedad de cultivos, esto los convierte en un blanco importante al realizar estudios de fitotoxicidad, ya que el compuesto a estudiar puede afectar de diferente manera los distintos organismos estudiados (Ver anexo: descripción de malezas colectadas).

A la par de los ensayos realizados en malezas, estas determinaciones se realizaron en plantas cultivadas de manera extensiva en el sitio de muestreo de las malezas; con el fin de determinar si el péptido aislado posee algún tipo acción fitotóxica selectiva a ciertos tipos de planta; por lo tanto, fueron empleadas cuatro plantas de interés: *Zea mays* (maíz), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Lactuca sativa* (lechuga) y *Solanum lycopersicum* (jitomate).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo de crecimiento de raíz en medio líquido

La determinación de inhibición de crecimiento radicular en malezas arrojó los siguientes resultados.

Pudiéndose observar una inhibición significativamente diferente con respecto al control ($p < 0.01$) en las malezas *Bidens odorata*, *Amaranthus hybridus*, *Cuscuta sp.* y *Parthenium bipinnatifidum*, siendo remarcable la gran inhibición del crecimiento de la planta parásita *Cuscuta sp.* presentando un 62.88%, lo cual permite reconocer la capacidad del péptido para disminuir la actividad de elongación radicular de éstas plantas.

Cuadro 14. Inhibición de elongación radicular en malezas.

	<i>Bidens odorata</i>		<i>Amaranthus hybridus</i>		<i>Cuscuta sp.</i>		<i>Ageratum corymbosum</i>		<i>Parthenium bipinnatifidum</i>	
	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido
Media (cm)	0.87	0.63	1.09	0.81	2.275	0.84	0.69	0.73	0.86	0.62
C.V.	15.26%	17.65%	16.84%	18.94%	20.98%	19.74%	10.69%	15.27%	17.51%	10.20%
% Inhibición		26.92%		25.51%		62.88%		-36.59%		27.91%

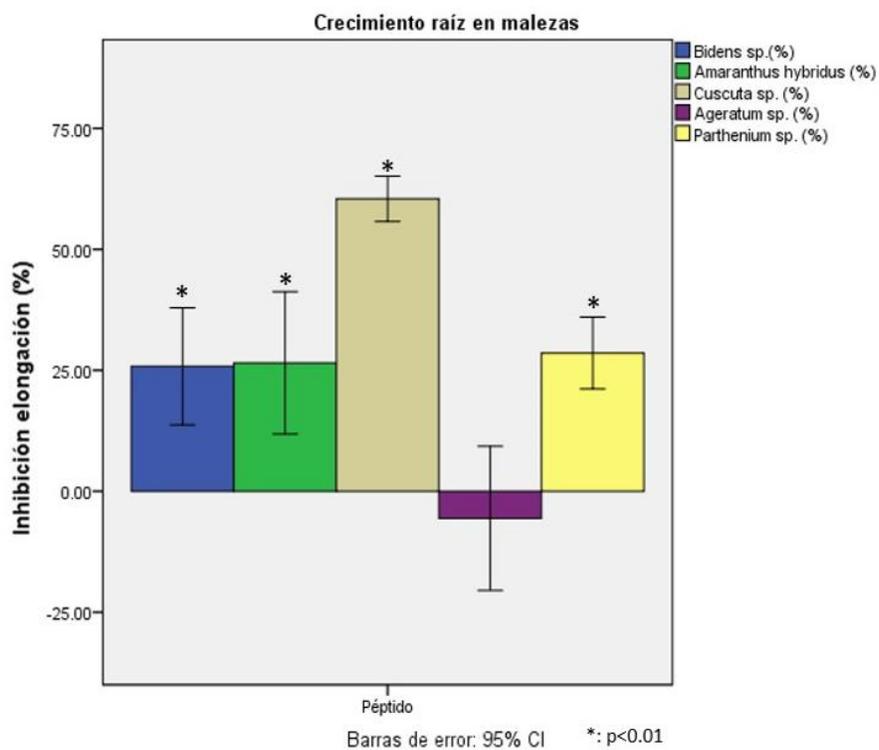


Figura 34. Inhibición de elongación radicular en malezas realizado con 30 raíces de las respectivas malezas, (*) representa una diferencia significativa con $p < 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de comparar la capacidad de inhibición del péptido en malezas y en plantas de cultivo, se puede observar el cuadro 15 donde se muestra la actividad inhibitoria del péptido a la misma concentración probada con las malezas, en ésta prueba se logra observar una inhibición significativa en la raíz de lechuga; sin embargo, en el caso de maíz, sorgo y jitomate, no se logra observar una gran diferencia en cuanto a inhibición de elongación.

Cuadro 15. Inhibición de elongación de raíz en plantas comerciales.

	<i>Lactuca sativa</i>		<i>Zea mays</i>		<i>Solanum lycopersicum</i>		<i>Sorghum bicolor</i>	
	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido	Blanco	Péptido
Media (cm)	0.83	0.65	0.55	0.53	0.58	0.65	0.62	0.61
C.V.	11.43%	10.88%	12.86%	15.31%	17.81%	-8.22%	14.82%	5.77%
% Inhibición		21.69%		3.03%		-12.07%		1.21%

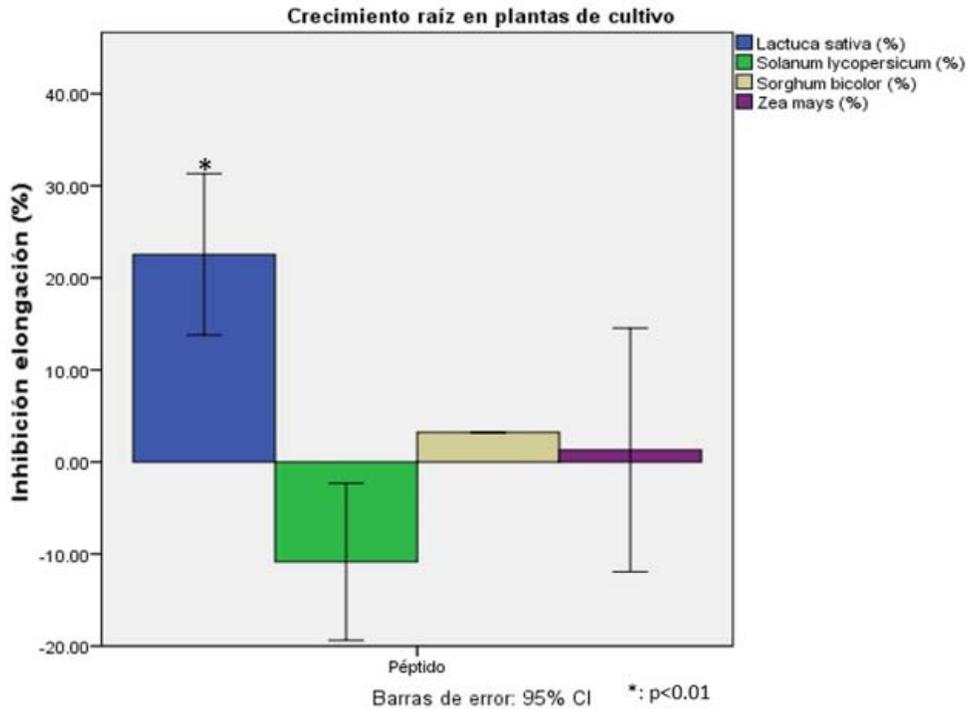


Figura 35. Inhibición de elongación radicular en plantas comerciales realizado con 30 raíces de las respectivas plantas de cultivo, (*) representa una diferencia significativa con p<0.01.

En ambos bioensayos es posible encontrar una gran variabilidad en los resultados, esto es debido a que al emplear plantas silvestres se encuentra una gran heterogenicidad genética, la cual afecta de manera directa en la variabilidad de los resultados obtenidos (Macías *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la figura 39 y 40, la inhibición de crecimiento radicular no fue la misma para todas las plantas tratadas, esto prueba la gran diferencia en sensibilidad de las plantas estudiadas; es importante subrayar la promoción de crecimiento radicular en la maleza *Ageratum corymbosum* que aunque no resulta ser significativamente diferente se observa un crecimiento; este comportamiento puede deberse a las condiciones hábitat de donde fue tomada, al ser una maleza que invade terrenos donde alguna vez se cultivó arroz, debe poseer una gran capacidad para soportar una gran variedad de aleloquímicos liberados a la rizósfera por la planta mencionada (Blum, 2014); un ejemplo de aleloquímico producido por el arroz es la momilactona A y B exudada por raíces durante toda su vida y encargada de inhibir el crecimiento de malezas como *Echinochloa colonum* y *E. crus-galli* (Kato-Noguchi, 2011; Kato-Noguchi *et al.*, 2010; Reigosa *et al.*, 2006).

El hecho de que la lechuga haya probado ser sensible al péptido no es poco común, ya que ésta planta es una de las usadas para determinar la actividad fitotóxica de ciertos compuestos a muy bajas concentraciones, ha sido comprobada su alta sensibilidad ante metales pesados como Cd, Pb, Ni y Cu (Di Salvatore *et al.*, 2008), y ante herbicidas como terbutrin y triasulfuron en concentraciones de 10^{-5} M (Macías *et al.*, 2000).

La resistencia mostrada por las plantas de maíz y sorgo puede deberse al tamaño de la raíz, ya que éstas presentan un mayor diámetro, y por ende existe una relación herbicida/raíz diferente con respecto a las demás plantas, lo cual indica que hay menor cantidad de herbicida disponible por cantidad de tejido vegetal, es importante mencionar ésta característica especial, ya que el hecho de que la planta comercial reaccione de manera diferente con respecto a la maleza convierte al compuesto de prueba en un herbicida viable en el uso de cultivos de maíz o sorgo, invadidos con *Bidens odorata*, *Amaranthus hybridus*, *Cuscuta* sp. o *Parthenium bipinnatifidum* (Macías *et al.*, 2000; Varejão *et al.*, 2013).

Bioensayo en disco de hoja

Monitoreo de actividad alfa-amilasa

Los ensayos en disco de hoja fueron hechos en todas las plantas antes mencionadas, sin embargo solamente se logró observar halos de inhibición en los ensayos con las plantas *Cuscuta* sp., sorgo y maíz; en la figura 41 se muestran las observaciones hechas en este ensayo, siendo significativamente diferente la hidrólisis de sorgo y maíz en el tratamiento con péptido con respecto al control ($p < 0.01$).

Éstos resultados indican que la actividad enzimática del sorgo y maíz se vio disminuida, lo que puede ser correlacionada con la viabilidad tisular (González *et al.*, 2012) dado que es sabido que el crecimiento de las hojas va acompañado de un aumento en la biosíntesis de alfa amilasa, y esto puede ser correlacionado con la viabilidad del tejido, siendo semilla, raíz u hoja (Thoma *et al.*, 1971); aunado a esto, se tienen las observaciones mostradas en la figura 46 donde se muestra una marcada inhibición de la actividad alfa-amilasa.

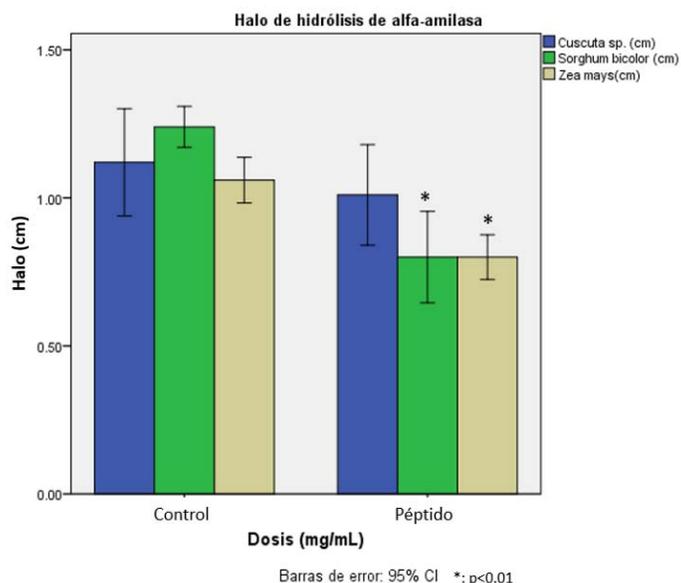


Figura 36. Comparación de diámetro de halo de hidrólisis de alfa-amilasa entre control y tratado con péptido realizado con 10 discos de las respectivas plantas, (*) representa una diferencia significativa con $p < 0.01$.

Figura 37. Imágenes del agar White + almidón revelado con solución de yodo.

Planta	Alfa-amilasa	
	Control	Tratamiento
<i>Cuscuta</i> sp.		
<i>Zea mays</i>		
<i>Sorghum bicolor</i>		

Como se puede observar en las imágenes de la figura 42, el agar correspondiente al sorgo en su tratamiento con péptido presenta un halo de hidrólisis poco notorio, mostrando una baja actividad alfa-amilasa, de lo cual se puede inferir un daño notable al tejido y una menor viabilidad con respecto a su control y al maíz y *Cuscuta* sp. Sin embargo, con estos resultados se puede establecer un orden en el grado de daño tisular, siendo:

Sorgo > Maíz > *Cuscuta* sp.

Se considera a *Cuscuta* el género menos dañado debido al diámetro del halo de inhibición y al color de los halos, siendo color marrón, lo que representa una completa hidrólisis del almidón presente en el agar; lo que se observa por el contrario en el tratamiento de maíz, es un halo color azul, lo que indica la existencia de cierta concentración de almidón en el agar.

Los tejidos que no presentaron reacción en el agar almidón fueron aquellos provenientes de plantas dicotiledóneas; esto puede deberse a la baja actividad enzimática con respecto a las gramíneas y el género *Cuscuta*. Se ha demostrado que *Cuscuta reflexa* posee una gran actividad amilasa a lo largo de sus filamentos, siendo encontradas actividades desde 3.10 hasta 7.14 U/mg dependiendo de la región de la planta (Singh *et al.*, 1970).

Monitoreo de presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para observar a nivel macro y microscópico el efecto del tratamiento en las hojas de las plantas se empleó la tinción de 3,3'- diaminobencidina (DAB) la cual en presencia de peróxido de hidrógeno y proteínas con grupo hemo como las peroxidasa, genera un precipitado color negro.

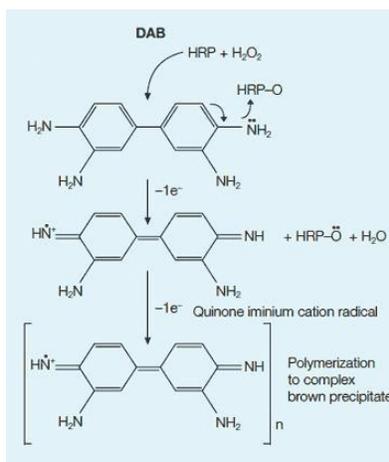


Figura 38. Reacción de oxidación de 3,3' – diaminobencidina en presencia de H₂O₂ y peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, 2016).

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 44 y 45, se observa a nivel macroscópico y microscópico la presencia del producto precipitado por la acción del H₂O₂ y la enzima peroxidasa; como se puede ver en la figura 44 (de malezas), existe una gran producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las malezas *A. corymbosum*, *B. odorata*, *P. bipinnatifidum* y *Cuscuta* sp.

La figura 45 (de cultivos) muestra en *L. sativa*, *Z. mays* y *S. bicolor* el aumento en la presencia de ROS tanto en el tratamiento con péptido como en el control positivo; mostrando en todos los casos una gran cantidad de DAB oxidado.

Es interesante hacer notar la poca presencia de DAB oxidado en la maleza *Amaranthus hybridus* tanto en el control negativo como en el tratamiento con péptido a comparación del tratamiento con herbicida (solución Atrazina/S-metolaclor 10⁻² M). A su vez, *Solanum lycopersicum* presentó una mayor coloración en el control negativo que en el tratamiento con péptido y herbicida.

A pesar de ser observadas estas excepciones en la producción de ROS por parte de *Solanum lycopersicum*, se vio el mismo comportamiento de marchitez presente en las demás plantas y malezas tratadas con péptido. Por el contrario, el comportamiento de las hojas de *Amaranthus hybridus* fue congruente con respecto a las observaciones de ROS, ya que tanto el control negativo como el tratamiento con péptido carecieron de marchitez o alguna disminución en la firmeza de la hoja mientras que las hojas tratadas con herbicida presentaron una gran producción de ROS e inicios de marchitez.

Estos resultados muestran que un aumento en la producción de ROS que puede ser provocada por varios mecanismos bioquímicos en la planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los motivos por los cuales la planta genera ROS es el estrés mecánico, éste podría ser considerado como un falso positivo en los experimentos al realizar cortes de disco de hoja; sin embargo, todos los controles negativos presentan un halo de DAB oxidado solamente en los bordes del corte (figura 46), lo cual elimina el factor de estrés mecánico como posible desencadenante de la producción de ROS.

Eliminando la posibilidad de que la presencia de ROS es debida a estrés mecánico, ésta reacción puede deberse a estrés abiótico causado por herbicidas o biótico causado tanto por hipersensibilidad a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) como por efectores moleculares desencadenantes de inmunidad.

Es sabido que algunos de los herbicidas pueden causar estrés oxidativo derivado de su mecanismo de acción; un ejemplo de éstos puede ser el grupo A de herbicidas, los cuales inhiben la enzima acetil CoA carboxilasa, que además de interrumpir la biosíntesis de ácidos grasos provoca la liberación de una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (Délye, 2013), sin embargo es conocido que éstos herbicidas en su mayoría afectan a monocotiledóneas (Powles y Yu, 2010), lo cual no es congruente con los resultados obtenidos.

Otro herbicida perteneciente al grupo de las auxinas sintéticas es conocido por provocar una gran cantidad de ROS; el 2,4-D a concentraciones altas genera daño celular debido a ROS inducidos por ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Pazmiño *et al.*, 2012; Duke y Dayan, 2011). Los signos mostrados por la planta debido a la exposición a este herbicida son enchinamiento y crecimiento longitudinal de las hojas y muerte, lo cual no es parecido a lo que ocurre con las hojas tratadas con péptido.

También, se conocen los herbicidas paraquat y diquat como inductores de daño por generación de ROS debido a que inhibe la regeneración de agentes antioxidantes como ácido ascórbico o NADPH (Lascano *et al.*, 2012; Cummins *et al.*, 1999). Los signos presentados en la planta debido al contacto con estos herbicidas son parecidos a los observados en las hojas tratadas con el péptido, provocando marchitamiento en pocas horas y necrosis después de esto (Duke y Dayan, 2011), sin embargo el herbicida no es capaz de transportarse a otras partes de la planta debido a la rápida necrosis del tejido en contacto, lo cual no es congruente con los resultados obtenidos en el bioensayo de infiltración con *A. thaliana* (siguiente apartado).

Los herbicidas inhibidores de PROTOX son también causantes de una gran cantidad de ROS, ya que al aumentar la cantidad de protoporfirina IX en el tejido y estar en contacto con luz y oxígeno molecular generan especies reactivas de oxígeno, causando daño celular y quemaduras en el tejido (Duke y Dayan, 2011; Boger y Wakabayashi, 1995).

Otro factor que puede provocar una ráfaga de ROS es la respuesta inmune activada por PAMP, ésta respuesta es desencadenada por el reconocimiento de ciertas moléculas asociadas a patógenos por parte de proteínas reconocedoras de patrones moleculares (PRR) existentes en la membrana celular (Jones y Dangl, 2006; Ojito-ramos y Portal, 2010); la moléculas que desencadenan éste tipo de resistencia pueden ser fragmentos de biopolímeros relacionados con microorganismos patógenos, ejemplos de éstos compuestos pueden ser flagelina, peptidoglucano bacterial o quitina fúngica (Daudi *et al.*, 2012; Spoel y Dong, 2012).

Al ser activada la respuesta inmune, la planta genera especies reactivas de oxígeno en el espacio apoplástico gracias a NADHP oxidasas en membrana plasmática y peroxidasas en la membrana celular, las especies activadas de oxígeno que se encargan de dañar al organismo invasor son H_2O_2 y O_2^-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(Bindschedler *et al.*, 2006; Daudi *et al.*, 2012); estudios recientes han mostrado que las especies reactivas de oxígeno no solamente está encargadas de dañar al organismo invasor sino que también actúan como moléculas de señalización, donde pueden afectar la expresión genética para promover aclimatación si se trata de estrés abiótico o respuesta ante estrés biótico como engrosamiento de pared celular o apoptosis (Miller *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010).

El hecho de que en todos los casos se haya encontrado que el tratamiento con péptido haya causado marchitez en las hojas, y que a su vez se hubiera detectado una gran cantidad de ROS en el tejido, indica que el daño causado en el tejido fue causado por algún tipo de estrés oxidativo.

Aunado a esto, se puede observar la falta de actividad en la maleza *A. hybridus*, por lo que es posible inferir algún tipo de reconocimiento entre género que impide que ésta planta desencadene una hipersensibilidad ante el tratamiento con el péptido, a partir de estos resultados se podría inferir que el péptido producido por *A. hypochondriacus* es capaz de desencadenar una reacción de hipersensibilidad mediada por ROS en las plantas tratadas, el cual no afecta a *A. hybridus* al ser una planta del mismo género y posiblemente pueda producirla de manera endógena provocando que ésta especie no la reconozca como extraña.

Figura 39. Imágenes de las tinciones DAB hechas en distintas malezas.

Planta	ROS					
	Control negativo		Tratamiento péptido		Control positivo	
<i>A. hybridus</i>						
<i>A. corymbosum</i>						
<i>B. odorata</i>						
<i>P. bipinnatifidum</i>						
<i>Cuscuta sp.</i>						

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 40. Imágenes de las tinciones DAB hechas en distintas plantas cultivables.

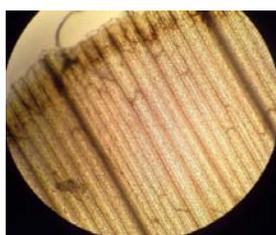
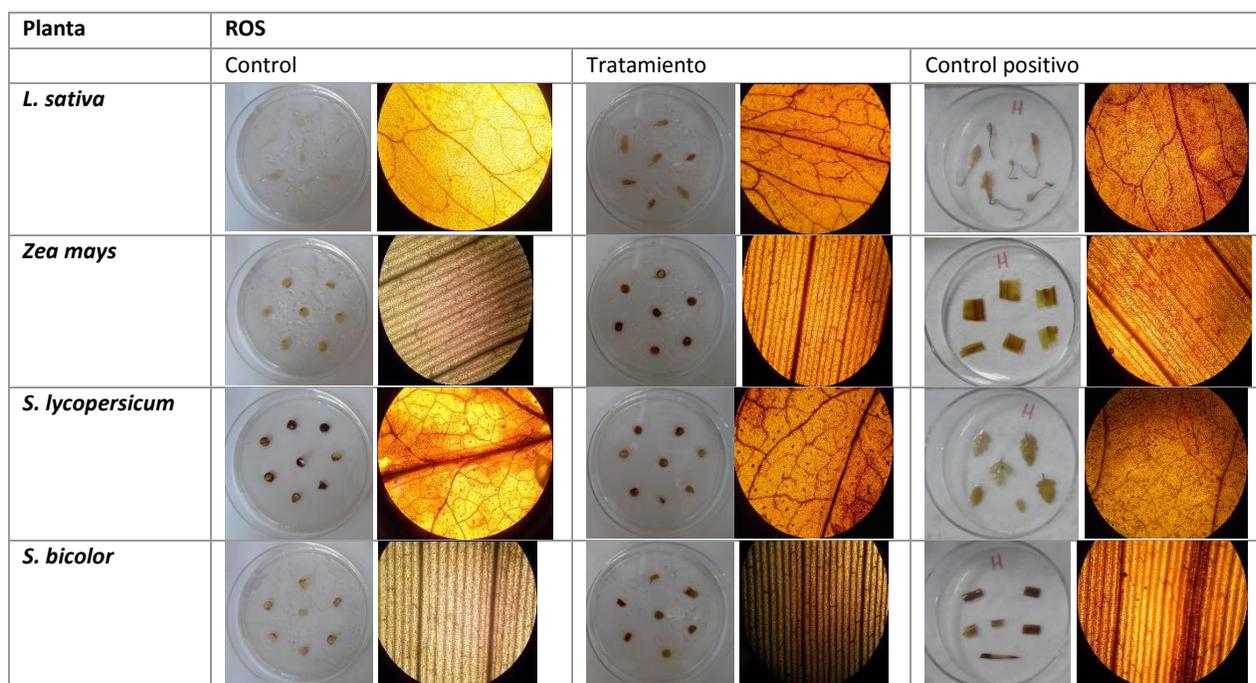


Figura 41. Ejemplo de estrés mecánico debido al corte del disco de hoja en tejido de hoja de maíz con tratamiento control.

Cuadro 16. Resumen de resultados arrojados por el bioensayo en disco de hoja.

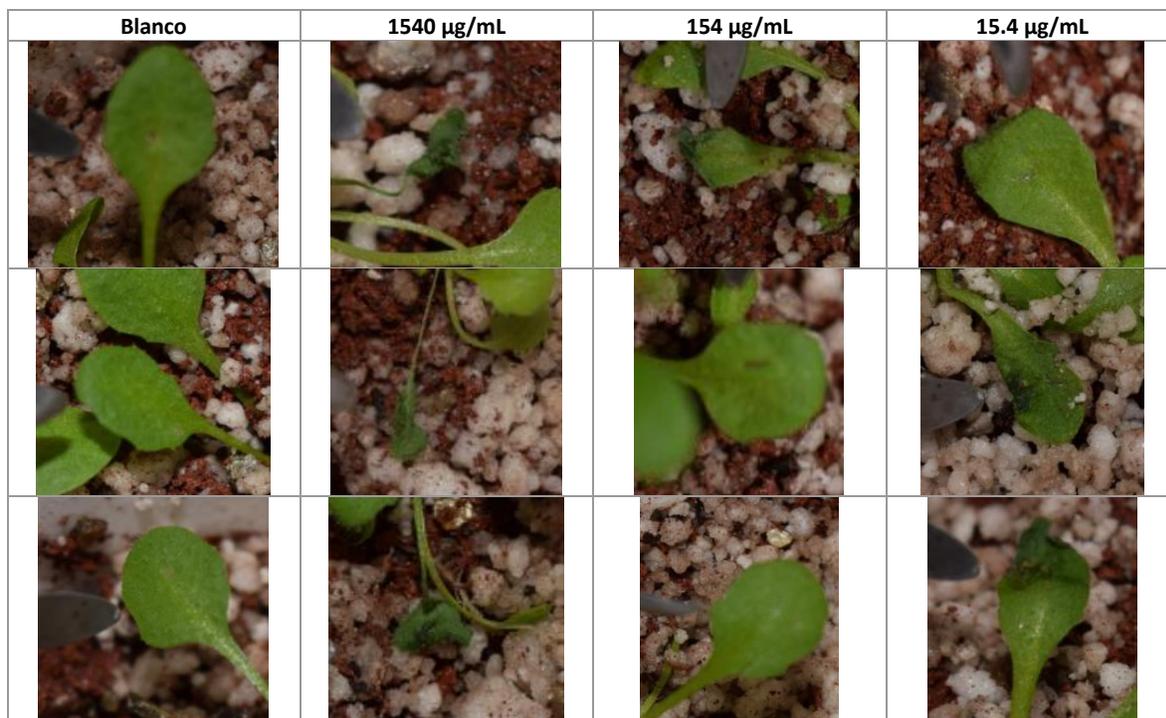
Planta	Apariencia (marchitez)			Alfa-amilasa (halo de hidrólisis)		ROS (intensidad visual)		
	Control	Tratamiento 0.75 mg/mL	Herbicida Atrazina/S- metolaclor 10 ⁻² M	Control (cm)	Tratamiento 0.75 mg/mL (cm)	Control	Tratamiento 0.75 mg/mL	Herbicida Atrazina/S- metolaclor 10 ⁻² M
<i>B. odorata</i>	0%	80%	100%	-	-	+	+++++	+++++
<i>A. hybridus</i>	0%	40%	70%	-	-	-	++	+++++
<i>Cuscuta sp.</i>	-	-	-	1.12	1.01	-	++	++
<i>A. corymbosum</i>	0%	70%	100%	-	-	-	++++	+++
<i>P. bipinnatifidum</i>	0%	60%	100%	-	-	-	+++++	+++
<i>Lactuca sativa</i>	0%	90%	100%	-	-	-	++++	+++
<i>Zea mays</i>	0%	80%	100%	1.06	0.8	-	++++	++
<i>Solanum lycopersicum</i>	0%	50%	100%	-	-	++++	+++	+
<i>Sorghum bicolor</i>	0%	100%	100%	1.24	0.8	-	++++	++++

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo de infiltración en hoja en *A. thaliana*

En la figura 47 se puede observar el efecto del péptido infiltrado, a diferentes concentraciones después de las 48 h, es posible observar en la columna correspondiente al blanco, la ausencia de necrosis o daño visible, mientras que la dosis más alta de péptido muestra en todas las plantas tratadas, una marcada necrosis afectando la hoja por completo hasta el peciolo, las dosis de 154 y 15.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no muestran daño significativo alrededor de la zona de aplicación.

Figura 42. Monitoreo a 48 h de hoja infiltrada.



La figura 48 muestra el desarrollo de las plantas tras 4 semanas de haber sido infiltradas, observándose la muerte de dos de las tres plantas tratadas con péptido a la concentración más baja, a su vez se observó la muerte de 1 planta en la concentración de 154 $\mu\text{g}/\text{mL}$; mientras que las plantas tratadas con blanco y con péptido a la concentración más alta continúan viables, cabe poner de manifiesto un menor crecimiento foliar de todas las plantas tratadas con respecto al blanco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 43. Crecimiento de *A. thaliana* a 4 semanas de tratamiento con péptido.

La figura 49 muestra la comparación de desarrollo foliar y radicular de las plantas a las 6 semanas de haber sido infiltradas, es posible notar un menor desarrollo en las plantas tratadas con respecto al control; la supervivencia de las plantas tratadas con la mayor dosis puede deberse a la muerte de la hoja infiltrada, por lo que el péptido no es transportado al resto de la planta, se puede observar que una menor concentración de péptido es capaz de disminuir el crecimiento de la planta tanto a nivel foliar como a nivel radicular, provocando incluso la muerte del organismo.

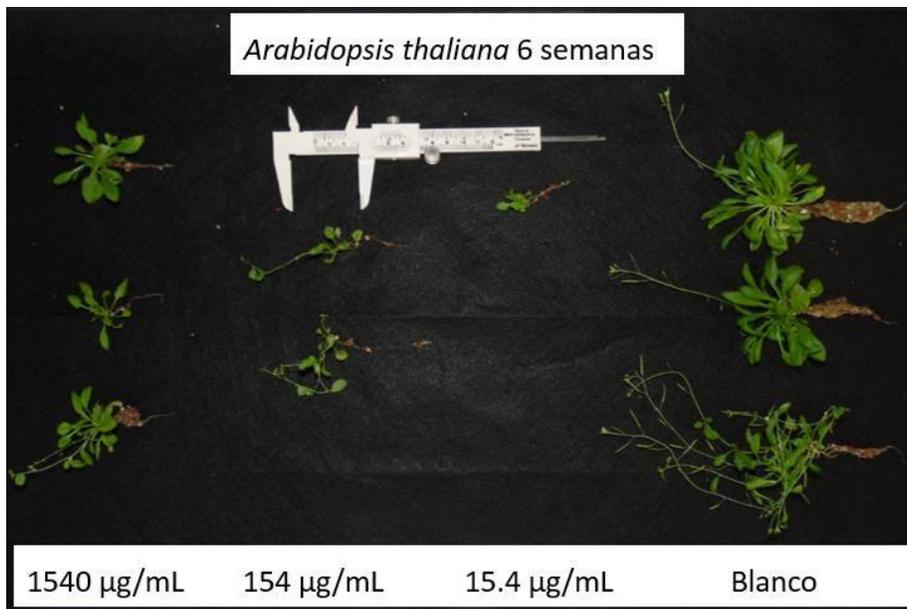


Figura 44. Crecimiento de *A. thaliana* a 6 semanas de tratamiento con péptido.

La necrosis presentada por la hoja y el poco crecimiento posterior al tratamiento, pueden indicar la existencia de inmunidad desencadenada por efector, la cual genera una respuesta de hipersensibilidad que desemboca en necrosis local, pero a su vez propicia la activación de respuesta inmune a lo largo de toda la planta (Jones y Dangl, 2006), se ha observado que la respuesta inmune puede manifestarse como resistencia de amplio espectro prevaleciendo al menos durante 20 días en plantas de tabaco (Spoel y Dong, 2012); por otro lado, el crecimiento retardado de éstas plantas puede deberse al estrés oxidativo al que estuvo expuesto, se ha observado que plantas a las cuales se les ha inmunizado el crecimiento se ve afectado, disminuyendo su tamaño (Spoel y Dong, 2012).

Aplicación probable

El uso de péptidos a nivel agronómico es una práctica ampliamente conocida, siendo empleados como “Fertilizantes Premium” (Zheng-yi *et al.*, 2014), con el objetivo de liberar nitrógeno mediante la conversión de los péptidos en aminoácidos y posteriormente en NH_4^+ (Ma *et al.*, 2008; Yang y Lu, 2010); sin embargo, estos compuestos han demostrado tener efectos que van más allá de la nutrición, siendo un ejemplo el empleo del hidrolizado de maíz como herbicida de preemergencia y fertilizante rico en nitrógeno (Pasupuleti y Demain, 2010) y los péptidos antimicrobianos capaces de combatir virus, bacterias, hongos y parásitos (Montesinos y Bardají, 2008); por lo tanto, el hecho de haber sido descubierto un péptido proveniente de las semillas de *Amaranthus hypocondriacus* con actividad fitotóxica mostrada en raíces y hojas de malezas, muestra una alternativa para el control de malezas mediante el empleo de éste péptido.

A pesar de que el péptido aislado no posee la misma potencia que los herbicidas empleados actualmente, es importante mencionar que las prácticas agrícolas actuales están enfocadas en el uso racional de herbicidas en conjunto con otras técnicas agronómicas. Siendo de suma importancia el empleo de sustancias con actividad fitotóxica que a su vez sean seguras para el medio ambiente; siendo una buena opción el uso de compuestos proteicos, los cuales han demostrado tener una vida media de 3 a 12 horas en suelo (Ma *et al.*, 2008).

Este compuesto al mostrar una actividad tóxica a nivel foliar en la mayoría de las plantas estudiadas puede ser candidato a uso como herbicida post-emergencia de tipo no selectivo; a su vez, el hecho de provocar una disminución en el crecimiento radicular de las malezas y no en las plantas de interés económico puede convertirlo en un herbicida de carácter selectivo y de uso pre-emergente.

8. Conclusiones

1. Se logró el aislamiento biodirigido de un compuesto proteico, encontrándose un péptido con 3.909 kDa, poseyendo seis cisteínas que a su vez forman tres puentes disulfuro.
2. Se evaluó la actividad de éste péptido en plantas cultivables y en malezas, empleándolo en ensayos de inhibición elongación de raíz, producción de marchitez en hoja y promoción de producción de especies reactivas de oxígeno; observando que las malezas *Bidens odorata*, *Amaranthus hybridus*, *Cuscuta* sp. y *Parthenium bipinnatifidum* son susceptibles a la acción del péptido a nivel radicular, mientras que solamente las raíces de la planta de jitomate son susceptibles al péptido.
3. Se observó que el contacto foliar del péptido con todas las plantas empleadas provocó una respuesta de marchitez y una gran producción de ROS, siendo la única excepción el caso de la planta *Amaranthus hybridus*. Ésta reacción invita a cuestionar los motivos por los cuales ésta planta no es afectada por la acción del péptido.
4. Se evaluó la actividad de éste péptido en la planta modelo *A. thaliana*, encontrando que éste péptido puede afectar de manera sistémica el crecimiento de la planta al ser infiltrado en sólo una de las hojas.

9. Perspectivas

- Es importante tener en cuenta que la secuenciación del péptido no fue obtenida, por lo que es importante obtener suficiente muestra para poder llevar a cabo una secuenciación mediante la técnica de degradación de Edman.
- Obtenida la secuencia es posible realizar una búsqueda para poder conocer su relación con otros péptidos ricos en cisteína.
- Para saber si el péptido afecta de manera exclusiva a otras plantas, es interesante realizar el estudio en la planta productora y en algunas plantas del mismo género como *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus retroflexus*, etc.

10. Anexos

Composición de medio Murashige-Skoog

Ingredients	milligrams/litre
Potassium nitrate	1900.00
Ammonium nitrate	1650.00
Calcium chloride.2H ₂ O	440.00
Magnesium sulphate	180.69
Potassium phosphate monobasic	170.00
Manganese sulphate.H ₂ O	16.90
Boric acid	6.20
Potassium iodide	0.83
Molybdcic acid (sodium salt).2H ₂ O	0.25
Zinc sulphate.7H ₂ O	8.60
Copper sulphate.5H ₂ O	0.025
Cobalt chloride.6H ₂ O	0.025
Ferrous sulphate.7H ₂ O	27.80
EDTA disodium salt. 2H ₂ O	37.30
myo - Inositol	100.00
Thiamine hydrochloride	0.10
Pyridoxine hydrochloride	0.50
Nicotinic acid (Free acid)	0.50
Glycine (Free base)	2.00
Sucrose	30000.00
Agar	7000.00
TOTAL gm/litre	41.54

Composición de medio basal White

<u>Contents:</u>	<u>mg/L</u>
Boric Acid	1.50
Calcium Nitrate (vacuum-dried)	200.0
Ferric Sulfate	2.50
Magnesium Sulfate Anhydrous	360.0
Manganese Sulfate Monohydrate	5.040
Potassium Chloride	65.0
Potassium Iodide	0.750
Potassium Nitrate	80.0
Sodium Phosphate Monobasic	16.50
Sodium Sulfate Anhydrous	200.0
Zinc Sulfate Heptahydrate	2.670

0.934 g of powder required to prepare 1 L of medium

Certificado de determinación taxonómica



Universidad Nacional
Autónoma de México



HERBARIO NACIONAL DE MÉXICO

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

8 de marzo de 2016.

Dr. Manuel Soriano García.
Investigador del Instituto de Química
Presente:

Hago de su conocimiento las determinaciones taxonómicas realizadas en el Herbario Nacional, de los ejemplares recolectados por Cristian Fabián Salinas Manzo en Malinalco, Estado de México.

Colecta No. 2: *Amaranthus hybridus* L., det. Rafael Torres Colín

Colecta No. 6: *Parthenium bipinnatifidum* (Ortega) Rollins, det. J.L. Villaseñor

Colecta No. 7: *Bidens odorata* Cav., det. Oscar Hinojosa Espinosa

Colecta No. 4: *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., det. Oscar Hinojosa Espinosa

Colecta No. 10: *Ageratum corymbosum* Zuccagni, det. Oscar Hinojosa Espinosa

Colecta No 12: *Salvia hispánica* L., det. María del Rosario García Peña

Atentamente,

Blanca Verónica Juárez Jaimes
Programa de determinación.

Descripción de malezas colectadas

***Bidens odorata* Cav.**

Según CONABIO *Bidens odorata* Cav. afecta cultivos de alfalfa, algodón, arroz, avena, cacahuate, calabaza, caña, cebada, chile, fresa, frijol, haba, jitomate, maíz, mango, nopal, papa, sorgo, tomate y uva.

Ésta planta puede encontrarse durante todo el año en diferentes estados fenológicos siempre y cuando esté en terrenos de riego, sus semillas se dispersan pegadas al pelaje de animales y a la ropa del humano, germina en el primer centímetro del suelo.

Es endémica de México y se puede encontrar prácticamente en todos los estados exceptuando la península de Yucatán (Vibrans 2016) por lo tanto es útil para emplearse como organismo de prueba para encontrar actividad fitotóxica.



Figura 45. Invasión de *Bidens odorata* y *Parthenium bipinnatifidum* en cultivo de mostaza (izquierda) y *Bidens odorata* en cultivo de maíz (derecha), fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.

***Cuscuta* sp.**

Los miembros de este género de planta parásita están distribuidos por todo el mundo, y es conocida su capacidad destructiva en cultivos de tomate, alfalfa, arándano y leguminosas (Kim & Westwood 2015; Vibrans 2016).

A su vez éste género es capaz de intercambiar con la planta hospedera desde moléculas como carbohidratos y ácidos nucleicos hasta virus y fitoplasma por medio de sus conexiones llamadas haustorio (Kim & Westwood 2015); éstas características convierten al género en una importante maleza la cual es necesario controlar dentro de cultivos y por lo tanto es relevante como organismo de prueba para encontrar actividad fitotóxica.



Figura 46 *Cuscuta* sp. afectando cultivo de chía; fotografía tomada en municipio de Malinalco, Estado de México.

Amaranthus hybridus

Reportes hechos por CONABIO sobre *Amaranthus hybridus* indican una afección a cultivos de aguacate, alfalfa, algodón, arroz, avena, cacahuate, café, calabaza, caña, cebada, cártamo, cebolla, chile, cítricos, col, estropajo, frijol, frutales, garbanzo, girasol, haba, hortalizas, jitomate, linaza, maíz, mango, manzana, nardo, nopal, okra, papa, soya, trigo, tomate, uva, entre otros.

Reportada en todos los estados de la república mexicana; ésta planta tiene un ciclo de vida anual y se reproduce por medio de semillas, las cuales llegan a contaminar las cosechas. Es conocido como hospedero del nematodo *Meloidogyne* sp., del hongo *Rhizoctonia* sp. de los áfidos *Acyrtosiphon* sp., *Aphis citricola*, *A. gossypii*, *A. nerii*, *Mizus persicae* y *Rhopalosiphum maidis* y es afectado por el *Virus del mosaico de amaranto* (Vibrans 2016; Igbagbo & Kehinde Titilope 2010).

Dadas éstas características, *Amaranthus hybridus* se convierte en un organismo útil en la evaluación del péptido aislado.



Figura 47. Invasión de *Amaranthus hybridus* en cultivo de maíz (izquierda), y en cultivo de chía (derecha) fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.

Parthenium bipinnatifidum

Ésta maleza se encuentra en casi todos los estados del país a excepción de las penínsulas de Yucatán y Baja California; es conocida por afectar cultivos de cebada y maíz (Vibrans 2016).

Al ser pariente cercana de *Parthenium hysterophorus* que también es considerada como una maleza, puede presentar las mismas características negativas para los cultivos, como actividad alelopática, alta competitividad por humedad y nutrientes del suelo y generación de una gran cantidad de semillas (Tanveer et al. 2015; Javaid et al. 2006). En cultivos de sorgo invadidos por *Parthenium* fueron estimadas pérdidas de rendimiento en un 40-95% y del 2-53% en cultivos de maíz (Safdar et al. 2016).

Al ser una maleza reconocida por su gran impacto en los cultivos, es importante evaluar nuevas alternativas de herbicidas que puedan tener efecto en ésta planta.



Figura 48. Invasión de *Parthenium bipinnatifidum* en cultivo de nardo (izquierda), y en cultivo de maíz (derecha) fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.

***Ageratum corymbosum* Zucc.**

Planta distribuida ampliamente por los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas y Michoacán (Ramírez & Herrera 2015).

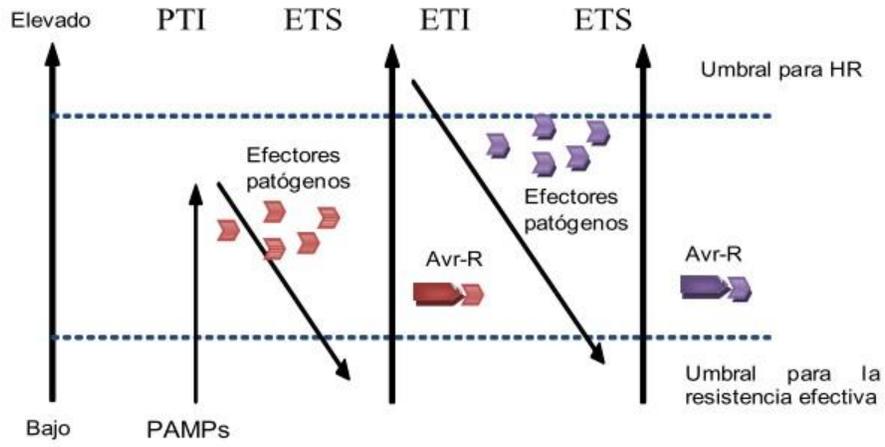
Al ser pariente cercana de *Ageratum houstonianum* puede compartir características de maleza, siendo reportada ésta última como maleza en cultivos de café (Vibrans 2016); en la región donde fue colectada se reporta como maleza en los cultivos de arroz, por lo que fue tomada en cuenta para los estudios posteriores.

Ésta planta no está reportada como maleza en las listas de CONABIO, sin embargo los pobladores de la zona de muestreo la identifican como una planta indeseable, por lo que fue empleada como organismo de estudio.



Figura 49. Terreno usado para el cultivo de arroz invadido por *Ageratum corymbosum* fotografías tomadas en municipio de Malinalco, Estado de México.

Diagrama de respuesta del sistema inmune en plantas



11. Referencias

- Altieri, M.A., 1999. *Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable* 1° Ed., Montevideo: Editorial Nordan-Comunidad.
- Babu, R.M., Sajeena A., Vidhyasekaran, P., Seetharaman, K. y Reddy, M. S., 2003. Characterization of a phytotoxic glycoprotein produced by *Phoma euphyrae* — A pathogen on water lettuce. *Phytoparasitica*, 31(3), pp.265–274.
- Bajwa, A.A., 2014. Sustainable weed management in conservation agriculture. *Crop Protection*, 65, pp.105–113. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.014>.
- Baker, H.G., 1974. The Evolution of Weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), pp.1–24.
- Bashan, B., Abadi, R. y Levy, Y., 1996. Involvement of a phytotoxic peptide in the development of the Northern leaf blight of corn. *European Journal of Plant Pathology*, 102(9), pp.891–893.
- Batish, D.R., Singh, H.P. y Kaur, S., 2001a. Crop Allelopathy and its Role in ecological Agriculture. *Journal of Crop Production*, 4(2), pp.121–161.
- Batish, D.R., Singh, H.P. y Kaur, S., 2001b. Crop Allelopathy and its Role in Ecological Agriculture. *Journal of Crop Production*, 4(2), pp.121–161.
- Beaven, G.H. y Holiday, E.R., 1952. Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. In *Advances in protein chemistry*. pp. 319–386. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323308600224>.
- Beckie, H.J. y Hall, L.M., 2014. Genetically-modified herbicide-resistant (GMHR) crops a two-edged sword? An Americas perspective on development and effect on weed management. *Crop Protection*, 66, pp.40–45. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219414002683>.
- Beckie, H.J. y Tardif, F.J., 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35, pp.15–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.018>.
- Bellec, F., Vélú, A., Fournier, P., Squin, S., Michels, T., Tendero y A. Bockstaller, 2015. Helping farmers to reduce herbicide environmental impacts. *Ecological Indicators*, 54, pp.207–216. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.020>.
- Biblioteca digital mundial, 1577. Historia general de las cosas de Nueva España por el fray Bernardino de Sahagún: el Códice Florentino. Libro X: del pueblo, sus virtudes y vicios, y otras naciones. Available at: <http://www.wdl.org/es/item/10621/#collection=florentine-codex> [Accessed September 23, 2015].
- Bindschedler, L. V., Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K., Stone, J. M., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D. R., Ausubel, F. M. y Bolwell, G. P., 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant Journal*, 47(6), pp.851–863.
- Blum, U., 2014. *Plant-Plant Allelopathic Interactions II*, Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-04732-4> http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0683-5_1.
- Boger, P. y Wakabayashi, K., 1995. Peroxidizing herbicides (I): Mechanism of action. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 50(3-4), pp.159–166.
- Boutin, C., Strandberg, B., Carpenter, D., Mathiassen, S. K. y Thomas, P. J., 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? *Environmental Pollution*, 185, pp.295–306. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.009>.

REFERENCIAS

- Buchner, V., Burstein, Y. y Nachmias A., 1989. A comparison of *Verticillium dahliae*- produced phytotoxic peptides purified from culture fluids and infected potato stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35, pp.253–269.
- Burke, I.C. y Bell, J.L., 2014. Plant Health Management: Herbicides. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 4, pp.425–440. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444525123001819>.
- Carresi, L., Pantera, B., Zoppi, C., Cappugi, G., Oliveira, A. L., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Scala, A. y Pazzagli, L., 2006. Cerato-platanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: Expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 49(2), pp.159–167.
- Creighton, T.E., 2004. *From Sequence to Structure* N. S. P. Ltd., ed.,
- Cruz-Cruz, C., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F. y Peña-Rodríguez, L. M., 2009. Production of hydrophilic phytotoxins by *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology*, 75(3), pp.191–195.
- Cummins, I., Cole, D.J. y Edwards, R., 1999. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant Journal*, 18(3), pp.285–292.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J. A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. M. y Bolwell, G. P., 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant cell*, 24(1), pp.275–87. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3289579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Daudi, A. y O'Brien, J.A., 2012. Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio-protocol*, p.2(18): e263. Available at: <http://www.bio-protocol.org/e263> [Accessed February 12, 2016].
- Délye, C., 2013. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: A major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science*, 69(2), pp.176–187.
- Délye, C., Jasieniuk, M. y Le Corre, V., 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), pp.649–658.
- Devlin, T.M., 1997. *Textbook of biochemistry with biochemical correlations*,
- Duke, S.O. y Dayan, F.E., 2011. *Bioactivity of Herbicides* Second Edi., Elsevier B.V. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00273-7>.
- Edwards, C.A., Lal, R., Madden, P., Miller, R. H. y House, G., 1990. *Sustainable Agricultural Practices* 1° ed. Soil and Water Conservation Society, ed., Ankeny, Iowa: Soil and Water Conservation Society.
- Egan, J.F., Bohnenblust, E., Goslee, S., Mortensen, D. y Tooker, J., 2014. Herbicide drift can affect plant and arthropod communities. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 185, pp.77–87. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.017>.
- Fogliano, V., Marchese, A., Scaloni, A., Ritieni, A., Visconti, A., Randazzo, G. y Graniti, A., 1998. Characterization of a 60 kDa phytotoxic glycoprotein produced by *Phoma tracheiphila* and its relation to malseccin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53, pp.149–161.
- Friend, J., 2012. *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships: Proceedings of The Phytochemical Society Symposium University of Hull, England April, 1975*, Available at: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=2l-2aqCijlC&pgis=1> [Accessed October 20, 2015].
- Hçfner G., Zepperitz C., Wanner, K. T., 2007. *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH.
- GE Healthcare, 2012. Size exclusion chromatography: Principles and Methods. *GE HealthCare Handbooks*, p.139.

REFERENCIAS

- González, R.G., Bravo, K.A.Q. y Caligari, P.D.S., 2012. Method and device for determining the viability of a plant sample. , 1(19). Available at: <https://www.google.com/patents/US20120309046>.
- Gonzalez-Andujar, J., 2008. Weed Control Models. In *Encyclopedia of Ecology*. pp. 3776–3780.
- Green, J.M., 2014. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Management Science*, 70(9), pp.1351–1357.
- Heap, I., 2015. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. *www.weedscience.org*. Available at: <http://weedscience.org/graphs/graphs.aspx> [Accessed August 31, 2015].
- Heap, I., The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at: <http://weedscience.org/documents/showdocuments.aspx?DocumentID=1193> [Accessed July 9, 2015].
- Heap, I.M., 1997. The Occurrence of Herbicide-Resistant Weeds. *Pestic. Sci.*, (51), pp.235–243.
- Igbagbo, E. y Kehinde Titilope, K., 2010. Effect of Amaranthus Mosaic Virus on the Growth Characters of Amaranthus hybridus. *Agriculture and Biology Journal Of North America*, 1(2), pp.75–79.
- Javaid, A. Shafique, S., Bajwa, R. y Shafique, S., 2006. Effect of aqueous extracts of allelopathic crops on germination and growth of Parthenium hysterophorus L. *South African Journal of Botany*, 72(4), pp.609–612.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–329. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108957>.
- Kato-Noguchi, H., 2011. Barnyard grass-induced rice allelopathy and momilactone B. *Journal of Plant Physiology*, 168(10), pp.1016–1020. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.12.021>.
- Kato-Noguchi, H., Hasegawa, M., Ino, T., Ota, K. y Kujime, H., 2010. Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology*, 167(10), pp.787–791. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.014>.
- Khanh, T.D., Chung, M. I., Xuan, T. D. y Tawata, S., 2005. Cropping and Forage Systems / Crop Ecology / Organic Farming The Exploitation of Crop Allelopathy in Sustainable Agricultural Production. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 191, pp.172–184. Available at: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118738615/PDFSTART>.
- Kim, G. y Westwood, J.H., 2015. Macromolecule exchange in Cuscuta–host plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 26(Table 1), pp.20–25. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526615000631>.
- Kobayashi, Y., Motose, H., Iwamoto, K. y Fukuda, H., 2011. Expression and genome-wide analysis of the xylogen-type gene family. *Plant and Cell Physiology*, 52(6), pp.1095–1106.
- Koodkaew, I., Matsuyama, S., Sunohara, Y., y Matsumoto, H., et al., 2012. Hapalocyclamide: A novel phytotoxic hexapeptide of the cyanobacterium Hapalosiphon sp. *Tetrahedron Letters*, 53(8), pp.977–979. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.12.048>.
- Koodkaew, I., Sunohara, Y., Matsuyama, S. y Matsumoto, H., 2012. Phytotoxic action mechanism of hapalocyclamide in lettuce seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, pp.23–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.002>.
- Bio-Rad Laboratories, 2016. Detection Methods | Aplicaciones y tecnologías | Bio-Rad. Available at: <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/detection-methods> [Accessed April 4, 2016].

REFERENCIAS

- Labrada, R., Caseley, J.C. y Parker, C., 2015. Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Available at: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s00.htm#Contents> [Accessed July 31, 2015].
- Lascano, R., Muñoz, N., Robert, G., Rodriguez, M., Melchiorre, M., Trippi, V. y Quero, G., 2012. Paraquat: an oxidative stress inducer. *Herbicides-Properties, synthesis and control of weeds*, (1993), pp.135–148.
- Ma, L., Ahuja, L. y Bruulsema, T.W., 2008. *Quantifying and understanding plant nitrogen uptake systems modeling*, CRC Press.
- Macías, F. a., Castellano, D. y Molinillo, J.M.G., 2000. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), pp.2512–2521.
- Martínez, E.N. y Añón, M.C., 1996. Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), pp.2523–2530. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf960169p>.
- Mazars, C., Hapner, K.D. y Strobel, G.A., 1984. Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycoprotein from culture filtrates of *Rhynchosporium secalis*. *Experientia*, 40(11), pp.1244–1247.
- Middleton, B., 2008. Invasive Species. *Ecological Engineering*, (Invasive Species), pp.2020–2028.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), pp.453–467.
- Miller, G., Shulaev, V. y Mittler, R., 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3), pp.481–489.
- Montesinos, E. y Bardají, E., 2008. Synthetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control. *Chemistry and Biodiversity*, 5(7), pp.1225–1237.
- Nachmias, A., Buchner, V., Tsrur, L., Burstein, Y. y Keen, N., 1987. Differential Phytotoxicity of Peptides from Culture fluids of *Verticillium dahliae* Races 1 and 2 and their Relationship to Pathogenicity of the Fungi on Tomato. *Phytopathology*, 77, pp.506–510.
- Ojito-ramos, K. y Portal, O., 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología Vegetal*, 10(1), pp.3–19.
- Parsons, D., Ramírez-Aviles, L., Cherney, J. H., Ketterings, Q. M., Blake, R. W. y Nicholson, C. F., 2009. Managing maize production in shifting cultivation milpa systems in Yucatán, through weed control and manure application. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 133(1-2), pp.123–134.
- Pasupuleti, V.K. y Demain, A.L., 2010. *Protein Hydrolysates in Biotechnology* V. K. Pasupuleti & A. L. Demain, eds., Springer Science+Business Media.
- Pazmiño, D.M., Romero-Puertas, M.C. y Sandalio, L.M., 2012. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(3), pp.1–3.
- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Munske, G. y Ryan, C. A., 2010. Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential - YISY - motif. *Peptides*, 31(11), pp.1973–1977. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.012>.
- Perzel, A., Park, K. y Fasman, G.D., 1992. Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide. *Analytical Biochemistry*, 203(1), pp.83–93.
- Powles, S.B. y Yu, Q., 2010. *Evolution in action: plants resistant to herbicides.*

REFERENCIAS

- Preston, C., 2014. Plant Biotic Stress: Weeds. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 4, pp.343–348. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444525123001698>.
- Price, N.P.J. Momany, F. A., Schnupf, U. y Naumann, T. A., 2015. Structure and disulfide bonding pattern of the hevein-like peptide domains from plant class IV chitinases. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, pp.25–30. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576514000800>.
- Qasem, J.R. y Foy, C.L., 2001. Weed Allelopathy, its Ecological Impacts and Futura Prospects. *Journal of Crop Production*, 4(2), pp.43–119.
- Ramírez, D. y Herrera, Y., 2015. Asteraceae en el durazno y cercanías, norte de tamazula, Durango (México): Riqueza, distribución y endemismo. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 9(2), pp.453–470.
- Reigosa, M.J., Pedrol, N. y González, L., 2006. *Allelopathy : A Physiological Process* M. J. Reigosa, N. Pedrol, & L. González, eds., Netherlands: Springer.
- Safdar, M.E., Tanveer, A., Khaliq, A. y Maqbool, R., 2016. Critical competition period of parthenium weed (*Parthenium hysterophorus* L.) in maize. *Crop Protection*, 80, pp.101–107. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219415301575>.
- Di Salvatore, M., Carafa, a. M. y Carratù, G., 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73(9), pp.1461–1464. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.061>.
- Sandermann, H., 2006. Plant biotechnology: ecological case studies on herbicide resistance. *Trends in Plant Science*, 11(7), pp.324–328.
- Sarpeleh, A., Wallwork, H., Tate, M. E., Catcheside, D. E., y Able, A. J., 2008. Initial characterisation of phytotoxic proteins isolated from *Pyrenophora teres*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), pp.73–79.
- Scilingo, A.A., Molina Ortiz, S. E., Martínez, E. N. y Aón, M. C., 2002. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Research International*, 35(9), pp.855–862.
- Shane Friesen, L.J., Ferguson, G.M. y Christopher Hall, J., 2000. Management strategies for attenuating herbicide resistance: Untoward consequences of their promotion. *Crop Protection*, 19(8-10), pp.891–895.
- Silverstein, K.A.T., Moskal, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D. y VandenBosch, K. A., 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant Journal*, 51(2), pp.262–280.
- Singh, D. V., Beg, M. U., Mattoo, R. K., Lal, P. N., Viswanathan, P. N. y Krishnan, P. S., 1970. Carbohydrate Metabolism in *cuscuta*. *Phytochemistry*, 9(1), pp.1779–1785.
- Singh, H.P., Batish, D.R. y Kohli, R.K., 2003. Allelopathic Interactions and Allelochemicals: New Possibilities for Sustainable Weed Management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3-4), pp.239–311.
- Smith, J.M. y Heese, A., 2014. Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leave tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods*, 10(1), p.6. Available at: <http://www.plantmethods.com/content/10/1/6>.
- Smith, P.K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), pp.76–85.

REFERENCIAS

- Spoel, S.H. y Dong, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 12(2), pp.89–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273771>.
- Srutek, M. y Urban, J., 2008. Organic Farming. In *Ecological Engineering*. pp. 2582–2587.
- Syan, H.S., Prasher, S. O., Pageau, D. y Singh, J., 2014. Dissipation and persistence of major herbicides applied in transgenic and non-transgenic canola production in Quebec. *European Journal of Soil Biology*, 63, pp.21–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.04.003>.
- Tanveer, A., Khaliq, A., Ali, H. H., Mahajan, G. y Chauhan, B. S., 2015. Interference and management of parthenium: The world's most important invasive weed. *Crop Protection*, 68, pp.49–59.
- Tejeda-Sartorius, O. y Rodríguez-González, M.T., 2008. Inhibidores de germinación y crecimiento de maleza y hortalizas, en residuos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Agrociencia*, 42(4), pp.415–423.
- Ten, L.N. Inoyatova, D. A., Mukhamedzhanov, S. Z. y Otroshchenko, O. S., 1982. Metabolites of the pathogenic fungus *Verticillium dahliae*. Primary structure of the polypeptide moiety of the phytotoxic pigment PKZh-1. *Chemistry of natural compounds*, 17(5), pp.464–469.
- Thermo Scientific, 2010. Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook Version 2 Table of Contents. *Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook Version 2*, p.42. Available at: www.thermoscientific.com/pierce.
- Thoma, J.A., Spradlin, J.E. y Dygert, S., 1971. 6 Plant and Animal Amylases. In *The Enzymes*. pp. 115–189. Available at: http://ac.els-cdn.com/pbidi.unam.mx:8080/S187460470860089X/1-s2.0-S187460470860089X-main.pdf?_tid=e2f9db52-d01f-11e5-92e2-0000aacb362&acdnat=1455127287_c4363f5722847bfbc1445c82dc90e9d9 [Accessed February 10, 2016].
- Varejão, E.V., Demuner, A. J., Barbosa, L. C. y Barreto, R. W., 2013. The search for new natural herbicides - Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protection*, 48, pp.41–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.008>.
- Vibrans, H., 2016. Malezas de Mexico - inicio Weeds of Mexico - home. Available at: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm> [Accessed January 18, 2016].
- Virgen-Ortiz, J.J., Ibarra-Junquera, V., Osuna-Castro, J., Escalante-Minakata, P., Mancilla-Margalli, N. y Ornelas-Paz, J., 2012. Method to concentrate protein solutions based on dialysis-freezing-centrifugation: Enzyme applications. *Analytical Biochemistry*, 426(1), pp.4–12.
- Weed Science Society of America, 2015. Biological Control | Weed Science Society of America. Available at: <http://wssa.net/weed/biological-control/> [Accessed September 17, 2015].
- Wetlaufer, D.B., 1963. Ultraviolet spectra Of Proteins and Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, 17, pp.303–390. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006532330860056X>.
- Yang, J. y Lu, C.Y., 2010. Possible mechanism associated with herbicidal activity of soybean meal hydrolysate (SMH). *Agricultural Sciences in China*, 9(6), pp.854–860. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60164-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60164-4).
- Zheng-yi, H.U., Yanfen, W., Silvia, H., y Ewald, S., 2014. Agronomic assessment of premium fertilizers. In *16th World Fertilizer Congress of CIEC*. pp. 79–80.