



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
Casa abierta al tiempo

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**MECANISMO DE DEFENSA DE LOS COTILEDONES DE LA PLÁNTULA
DE *IPOMOEA PURPUREA* ANTE EL DAÑO MECÁNICO: SU RELACIÓN ENTRE
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, FENOL OXIDASAS Y FENOL PEROXIDASAS**



T E S I S

que para obtener el título de:

Maestra en Biología Experimental

Presenta:

B. E. Berenice Guadarrama Flores

Director de Tesis: Dr. David M. Díaz Pontones

**Comité Tutorial: Dra. Judith G. Márquez Guzmán
Dr. F. Javier Plasencia de la Parra**

MÉXICO

DICIEMBRE, 2009



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Tisular. Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud. Área de Bioquímica y Fisiología Celular. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Unidad Iztapalapa. Universidad Autónoma Metropolitana

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, según No de registro 309-0

Mi total reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría, a través de la beca número 229754, durante el periodo de septiembre de 2006 a septiembre de 2009.

DIRECTOR ACADÉMICO

- **Dr. David Manuel Díaz Pontones**

Departamento de Ciencias de la Salud. División CBS.

Laboratorio de Bioquímica Tisular S-247

Línea de investigación: desarrollo y germinación de semillas

Tel./Ext.: 5804-4736 / 2707

e-mail: dpmd@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

- **Dra. Judith Márquez Guzmán**

Departamento de Biología Comparada

Facultad de Ciencias. UNAM

e-mail: jmg@fciencias.unam.mx

- **Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra**

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química. UNAM

e-mail: javierp@servidor.unam.mx

La presente Tesis titulada “*Mecanismos de defensa de los cotiledones de la plántula de Ipomoea purpurea ante el daño mecánico: su relación entre especies reactivas de oxígeno, fenol oxidasas y fenol peroxidasas*”, fue realizada por la B. E. Berenice Guadarrama Flores bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada y aceptada por los integrantes del Jurado de Examen de Grado designados por la División de Ciencias Biológicas de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa el 14 de diciembre de 2009.

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I
(Presidente)

Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Departamento de Bioquímica UNAM
(Secretario)

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Departamento de Biología Comparada UNAM
(Vocal)

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Departamento de Bioquímica UNAM
(Vocal)

AGRADECIMIENTOS

Fue Goethe quien escribió *“un hombre no puede ser el mismo después de cruzar el bosque”*. Confieso que he tomado esta metáfora para recorrer cada uno de los segundos, disueltos ya en el tiempo de estos aproximadamente dos años de maestría, en donde han sido tantas las vivencias, las sensaciones y los sentimientos, que en verdad, resultaría absurdo no ofrendar algunas líneas a todos aquellos que han dado soporte a este proyecto de vida.

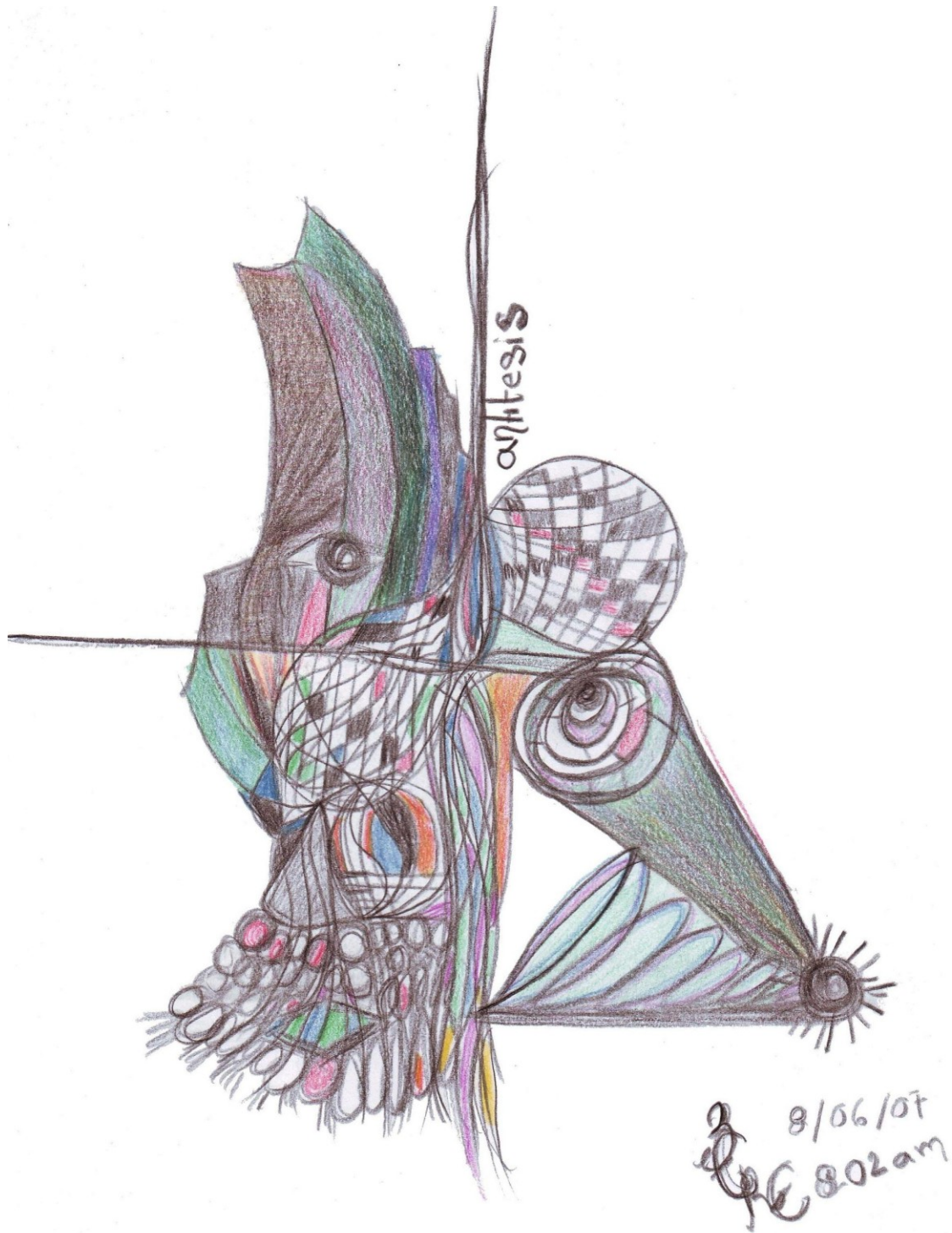
Agradezco a mis padres por confiar en mí y por la admiración que sienten por mi mundo. Quiero hacer un reconocimiento especial a mi madre por su vitalidad y su lucha diaria por todo lo relacionado con sus seres más queridos y a mi padre por la fortaleza y entusiasmo que nos muestra en cada travesía. A mis hermanos Ana y Héctor por todo su cariño y la confianza que me brindan en todo momento, pero sobre todo por estar cada uno a su manera respaldándome para alcanzar mis objetivos. A mi tío “Beto” por su cariño y apoyo. A mis abuelos por compartir parte de su existencia con migo. A Don “Gus” y Doña “Coty” mi más sincera gratitud por su confianza e inigualable afecto. Deseo agradecer muy especialmente a Mauricio por su incondicional apoyo moral, su comprensión y amor, por caminar junto a mi en los senderos desconocidos del paisaje de la existencia, sin tu estímulo este trabajo no habría podido concluirse.

Al Dr. David Díaz Pontones director de esta tesis, quien me brindo su respaldo y me enseñó que el valor de un equipo esta dado por la calidad humana de sus integrantes. Mi más sincera gratitud a la Dra. Judith Márquez Guzmán, al Dr. Javier Plasencia de La Parra, a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y al Dr. Fernando Díaz de León por sus valiosas aportaciones para mejorar el presente trabajo, por su estupendo don de gente y por todas y cada una de las facilidades para culminar este proyecto. Asimismo también le agradezco a la M. Elvira Soto por su orientación y apoyo en el principio de esta investigación. A la Dra. Mina Konigsberg F. Coordinadora del Posgrado en Biología Experimental por su disposición permanente por aclarar todas mis dudas.

A Isaac por tener la paciencia ante mis dudas de novata. A mi tocaya Bere por su entrañable amistad, a Rayn por su confianza y camaradería, gracias a ambos por todos aquellos formidables momentos que me han obsequiado

Quiero enfatizar mi enorme agradecimiento a la Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa (UAM-I), así como a todos aquellos maestros que contribuyeron realmente en mi formación durante mis estudios de Licenciatura y de Maestría.

Finalmente deseo agradecer profundamente a la vida por brindarme la oportunidad de emprender cada mañana una aventura hacia lo desconocido, por darme la fuerza necesaria para sonreír aún en aquellos momentos de precipicio; porque sé que es cierto lo que expresó Steiner *“cuando algo concluye, debemos pensar que algo comienza”*.



El futuro no es cierto
pero sucede...

América Silenciosa*

ÍNDICE TEMÁTICO

I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	i
II. ABREVIATURAS.....	ii
III. RESUMEN.....	1
IV. INTRODUCCIÓN.....	3
1. ANTECEDENTES	
I. <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth.....	6
<i>A. Ipomoea purpurea</i> como arvense	
II. ESTRÉS EN VEGETALES.....	7
III. MECANISMO DE DEFENSA EN PLANTAS	
A. BARRERAS FÍSICAS.....	8
B. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	9
1. Flavonoides.....	10
IV. ENZIMAS OXIDANTES DE FENOLES.....	12
V. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE	
LA RESPUESTA DE DEFENSA.....	13
VI. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	14
A. MECANISMOS DE DESTOXIFICACIÓN DE RADICALES LIBRES.....	16
B. INTERACCIÓN DE ERO CON OTRAS SEÑALES.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	21
A. HIPÓTESIS GENERAL	
B. HIPÓTESIS PARTICULARES	
4. OBJETIVOS.....	23
A. OBJETIVO GENERAL	
B. OBJETIVOS PARTICULARES	
5. METODOLOGÍA.....	25

A. MATERIAL BIOLÓGICO Y GENERACIÓN DEL DAÑO MECÁNICO.....	26
B. ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	27
1. Cuantificación de H ₂ O ₂ mediante Titulación Espectrofotométrica.....	27
2. Cuantificación de O ₂ ^{•-} mediante la reacción de XTT.....	28
3. Ubicación de O ₂ ^{•-} y H ₂ O ₂	28
C. ESTUDIO ENZIMÁTICO.....	29
1. Extracción Enzimática	
2. Cuantificación de Proteína Total	
3. Cuantificación Enzimática	
4. Determinación de Isoenzimas mediante Isoelectroenfoque	
5. Ubicación de la actividad enzimática de Cox, Cpx, y Gpx	
D. CONTENIDO DE FENOLES	30
1. Cuantificación de Fenoles	
a. Fenoles por Reactivo Folín	
b. Fenoles Reducidos	
c. Protoantocianidinas	
2. Ubicación de Fenoles	
E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
6. RESULTADOS	33
A. EFECTO DE LA LESIÓN EN LA CANTIDAD DE PROTEÍNA Y PESO FRESCO.....	34
1. DISEÑO CONTRA LATERAL	
2. DISEÑO SISTÉMICO	
B. ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	35
1. UBICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA ZONA DE LESIÓN.....	35
a. DISEÑO CONTRA LATERAL	
b. DISEÑO SISTÉMICO	
2. CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	37
a. DISEÑO CONTRA LATERAL	
b. DISEÑO SISTÉMICO	
3. UBICACIÓN DE SUPERÓXIDO EN LA ZONA DE LESIÓN.....	39
a. DISEÑO CONTRA LATERAL	
b. DISEÑO SISTÉMICO.....	40
4. CUANTIFICACIÓN DE SUPERÓXIDO.....	40
a. DISEÑO CONTRA LATERAL	
b. DISEÑO SISTÉMICO.....	42

c. LESIÓN CONTRA LATERAL: EFECTO DEL CuCl_2	44
C. ESTUDIO ENZIMÁTICO.....	45
1. UBICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	45
a. DISEÑO CONTRA LATERAL.....	45
b. DISEÑO SISTÉMICO.....	46
2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	47
a. DISEÑO CONTRA LATERAL.....	47
b. DISEÑO SISTÉMICO.....	49
3. DETERMINACIÓN DE ISOENZIMAS MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE.....	51
D. CONTENIDO DE FENOLES.....	55
1. UBICACIÓN DE FENOLES	
a. DISEÑO CONTRA LATERAL	
b. DISEÑO SISTÉMICO	
2. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES.....	56
a. DISEÑO CONTRA LATERAL.....	56
b. DISEÑO SISTÉMICO.....	57
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES.....	74
9. PERSPECTIVAS.....	77
10. BIBLIOGRAFÍA.....	79

I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

A. TABLAS

Tabla 1. Localización en la célula vegetal de las enzimas y compuestos que permiten la defensa contra la oxidación.....	17
Tabla 2: Queladores ó “atrapadores” de O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$, ó inhibidores de NAD(P)H oxidasa y peroxidasas.....	17
Tabla 3. Isoenzimas en la Lesión Contra Lateral.....	53
Tabla 4. Isoenzimas en la Lesión Sistémica.....	55

B. FIGURAS

Fig. 1. Clasificación Botánica de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth.....	6
Fig. 2 Esquema general de la degradación química ó térmica de la lignina hasta la formación de guayacol.....	9
Fig. 3: Biosíntesis de Flavonoides.....	11
Fig. 4: Estructura química de las catequinas.....	12
Fig. 5: Interconversión de ERO, derivadas de O_2	15
Fig. 6. Producción Bifásica de ERO en respuesta a daño mecánico, herbivoría ó patogénesis.....	16
Fig. 7. Producción de ERO y funciones en la respuesta a daño mecánico, herbivoría o patógenos.....	18
Fig. 8. Diseño experimental para la lesión contra lateral.	26
Fig. 9. Diseño experimental para la lesión sistémica.	27
Fig. 10: Diagrama del procedimiento utilizado para el análisis de ERO, para ambos modelos de lesión.	28

Fig. 11: Diagrama del procedimiento seguido en el estudio enzimático y en el estudio de fenoles, para ambos modelos de lesión.	31
Fig. 12: Cantidad de proteína y peso fresco; Diseño Contra Lateral.....	34
Fig. 13: Cantidad de proteína y peso fresco; Lesión Sistémica.....	35
Fig. 14: Ubicación de peróxido de hidrógeno en LChPI, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.....	36
Fig. 15: Ubicación del precipitado blanco en LChPI, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.....	36
Fig. 16: Cuantificación de H ₂ O ₂ , a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.....	38
Fig. 17: Cuantificación de H ₂ O ₂ , a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Sistémico. Se muestra la cantidad de H ₂ O ₂	39
Fig. 18: Ubicación de superóxido, en LChPI, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.	40
Fig. 19: Cuantificación de superóxido, utilizando TMP como quelante, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.	42
Fig. 20: Cuantificación de superóxido, utilizando TMP como quelante, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Sistémico.	44
Fig. 21: Cuantificación de superóxido utilizando CuCl ₂ como quelante, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Modelo Contra Lateral.	45
Fig. 22: Ubicación de la actividad enzimática de Cox, Cpx, Gpx y AECpx en LChPI, 24 horas posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.....	46
Fig. 23: Actividad enzimática de Cox, Cpx, Gpx y AECpx en SChPI, 24 horas posteriores a la herida; Lesión Sistémica.....	47
Fig. 24: Actividad Enzimática en el Diseño Contra Lateral.	48
Fig. 25: Proporción en la Actividad Enzimática de Cox, Cpx y Gpx, 24 horas después de realizada la herida; Diseño Contra Lateral.	49
Fig. 26: Actividad Enzimática en el Diseño Sistémico.	50

Fig. 27: Proporción en la Actividad Enzimática de Cox, Cpx y Gpx, 24 horas después de realizada la herida; Diseño de Lesión Sistémica.	51
Fig. 28. Zimograma del Diseño Contra Lateral.	52
Fig. 29. Zimograma del Diseño Sistémico.	54
Fig. 30: Ubicación de fenoles, en LChPI, 24 horas posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral	56
Fig. 31: Cuantificación de Fenoles, 24 horas posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral.	57
Fig.32: Cuantificación de Fenoles, 24 horas posteriores a la herida; Lesión Sistémica	58

II. ABREVIATURAS

Act. E.	Actividad Específica
AECpx.	Peroxidasas de Amino Etil Carbazol
AMP.	Proteínas Antimicrobianas
ANOVA.	Análisis de Varianza
ANR.	Antocianidin Reductasa
APX.	Ascorbato Peroxidasa
CaCl₂.	Cloruro de Calcio
CAT.	Catalasa
ChPl.	Cotiledón Herido de la Planta Lesionada
Cox.	Catequinoxidasa
Cpx.	Catequinperoxidasa
CsPl.	Cotiledón Sano de la Planta Lesionada
CsPs.	Cotiledón Sano de la Planta Sana
Cu-Zn-SOD.	Cobre-Zinc Superóxido Dismutasa
DMF.	N,N-Dimetil Formamida
E.	Estructura
EGCG.	Epigallocatequina
ERO.	Especies Reactivas de Oxígeno
GC.	Galocatequina
3GE.	Tres Grupos Experimentales
Gpx.	Guayacolperoxidasa
HCl.	Ácido Clorhídrico
H.D.T.I.	Homogeneizado Después de un Tiempo de Incubación
H.I.	Homogeneizado Inmediatamente
HR.	Respuesta de Hipersensibilidad
HyP.	Glucoproteínas Ricas en Hidroxiprolina
JA.	Ácido Jasmónico
LAR.	Leucoantocianidin Reductasa
LChPl.	Extremo del Cotiledón de la Planta Lesionada
LCsPl.	Extremo del Cotiledón de la Planta Lesionada
LCsPs.	Extremo del Cotiledón de la Planta Sana
MAPK.	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógeno
Mn-SOD.	Manganeso Superóxido Dismutasa.
NADPH.	Nicotiamida-Adenina Dinucleótido Fosfato
NBT.	Nitroazul de Tetrazolio
PAL.	Fenilalanina Amonio Liasa
PAs.	Protoantocianidinas
P. F.	Peso Fresco
pI.	Punto Isoeléctrico
POD.	Fenol peroxidasa
PPO.	Polifenoloxidasas
PR.	Proteínas de Defensa
Q.	Quelantes para O ₂ ⁻ y H ₂ O ₂
SA.	Ácido Salicílico
SAR.	Resistencia Sistémica Adquirida

SOD	Superóxido Dismutasa
T0	Intervalo cero de recuperación (minutos)
T20	Intervalo veinte de recuperación (minutos)
T30	Intervalo treinta de recuperación (minutos)
T120	Intervalo ciento veinte de recuperación (minutos)
T24	Intervalo veinticuatro de recuperación (horas)
TMP	Tetrakis (1-metil 4 piridil) Porfina
XTT	Fenilamino Carbonil Tetrazolio

III. RESUMEN

Ipomoea purpurea es una dicotiledónea de hábito rastrero y trepador, que pertenece a la familia Convolvulácea. Esta es considerada dentro de las 10 arvenses más importantes a nivel nacional. Compete por agua, luz, nutrimentos y bióxido de carbono, lo cual implica que en México anualmente se presente un decremento desde el 33% hasta la pérdida total en la producción del cultivo que invade. Las hojas cotiledonarias son fundamentales para la sobre vivencia y el establecimiento de esta especie, ya que la planta depende de las sustancias que se encuentran almacenadas en los cotiledones, mientras inicia el proceso de fotosíntesis. En el intervalo entre la protusión de la radícula (18 hr) y la generación de la primera hoja verdadera (más de 11 días), los gastos metabólicos deben ser aportados por las reservas y la síntesis de *novο* que realicen los cotiledones durante esta etapa; lo que implica que éstos órganos deben de poseer mecanismos de protección contra el daño mecánico, herbivoría y de patógenos. Por tanto los cotiledones son un modelo adecuado, para estudiar los mecanismos intrínsecos de defensa de la planta, lo cual posibilita encontrar factores de regulación claves para la sobre vivencia de esta arvense, y con ello en un futuro poder diseñar estrategias de control para esta maleza.

En este trabajo se utilizaron dos modelos de lesión mecánica (extracción de un cilindro de 1.58 mm de diámetro). El modelo contra lateral consistió en realizar la perforación en un extremo de ambos cotiledones. A diferencia del modelo sistémico donde únicamente se lesionó un extremo de uno de los dos cotiledones. Se determinó la actividad de la catequinoxidasa, catequinperoxidasa y guayacolperoxidasa, sus isoenzimas existentes, la cantidad de ión superóxido, peróxido de hidrógeno y compuestos fenólicos; además se ubicaron estos parámetros. En el caso del modelo contra lateral dichas mediciones se realizaron en el extremo herido y en el extremo sin daño de ambos cotiledones. En el modelo sistémico las cuantificaciones se realizaron en el cotiledón herido (extremo lesionado y no lesionado) y el cotiledón sin herida de la misma planta lesionada. Ambos modelos se contrastaron con los cotiledones de una plántula sana.

De los resultados obtenidos se desprende que en el modelo de lesión contra lateral, la generación de una herida a las 48 horas de embibición en un extremo de los cotiledones produce 24 horas después, un aumento en la actividad de catequinoxidasa (25 veces) > catequinperoxidasa (3 veces) > guayacolperoxidasa (1.5 veces) en comparación con los cotiledones de la planta sana. Dicha actividad, así como la producción de compuestos fenólicos se localizó alrededor del sitio de la

lesión. Del mismo modo el extremo sin daño del cotiledón lesionado posee una actividad mayor que el de la planta control pero menor al del extremo herido. El daño induce la aparición de una isoenzima con pI de 7.3 con actividad de peroxidasa. En el extremo lesionado es significativo el aumento en la cantidad de protoantocianidinas (PAs). De 0 a 120 minutos inmediatos a la lesión es significativo el decremento de superóxido; en este tiempo la cantidad de peróxido de hidrógeno en los cotiledones de la planta lesionada, no presenta cambios con respecto a los de la planta control. En este caso la producción de peróxido de hidrógeno y superóxido se localizaron en el cotiledón herido alrededor del sitio de lesión.

En el modelo de lesión sistémica al comparar el cotiledón herido contra el cotiledón sano de la misma planta los cambios en la actividad enzimática varían en el siguiente orden: Catequinoxidasa>Catequinperoxidasa>Guayacolperoxidasa (4; 1; 0.5). La actividad enzimática al igual que la producción de compuestos fenólicos, también se localizaron alrededor del sitio de lesión. El daño mecánico indujo a una isoenzima con pI de 4.8 en el cotiledón lesionado. Entre ambos cotiledones de la planta lesionada es significativo el aumento de fenoles reducidos, PAs y en el momento de la lesión la disminución del superóxido, ubicándose la producción de éste radical y del peróxido de hidrógeno alrededor del sitio de la lesión, en el cotiledón herido.

En esta serie de estudios se demostró que la catequinoxidasa es una enzima constitutiva cuya actividad puede ser adicionalmente inducida por una lesión, y relacionado a ésta aumenta la cantidad de PAs que son derivados de catequina, sustrato de la enzima. Esta respuesta es inducida tanto a nivel contra lateral como sistémico. Este sistema nos hace inferir que está asociado a la producción de compuestos astringentes, a la regulación y control de especies reactivas de oxígeno.

IV. INTRODUCCIÓN

Las malezas son aquellas plantas que invaden y afectan el desarrollo de otras especies de plantas, desplazando o perjudicando cultivos de mayor valor económico o deteriorando la calidad ganadera de los campos. La intensidad de los daños que las malezas ocasionan a los cultivos depende de varios factores, entre estos se encuentran el tiempo en que se mantiene en libre competencia con los cultivos, el tipo de especie infestante, la densidad de las poblaciones, la época de emergencia de las malas hierbas en relación con la de los cultivos, los sistemas de siembra prevalecientes, entre otros. Dentro de las malezas se encuentra el género *Ipomoea purpurea*, la cual es conocida también como campanita o manto de la virgen. En México esta planta, se encuentra catalogada desde los años 80 como una arvense importante ya que invade alrededor de 40 cultivos básicos, causando graves decrementos en la producción cuando no se controla en los periodos de establecimiento de la plántula.

El establecimiento de la plántula es una etapa crítica, la cual depende de la protección de los cotiledones fotosintéticos que acumulan sustancias de reserva, por ello estas estructuras deben contar con mecanismos de protección que le permitan establecerse exitosamente. La participación de polifenol oxidasas, fenol peroxidasas, especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos en los mecanismos de defensa hace que estos compuestos sean candidatos para ser estudiados y considerados dentro de los elementos que le proporcionan las ventajas adaptativas a esta especie.

Se ha demostrado que después de una lesión por daño mecánico ocurre la generación de especies reactivas de oxígeno, siendo ésta la primera respuesta detectada por la planta, la cual presenta un comportamiento bifásico. La fase I o fase inicial transitoria sucede en el orden de segundos a minutos. La fase II o fase persistente es de mayor amplitud y comienza de una a tres horas después que la fase inicial ha terminado. Ambas fases involucran sustratos y vías de inducción similares, sin embargo las dos fases se regulan de manera independiente. La especie de reactivas mayoritariamente detectada es el superóxido, seguido del peróxido de hidrógeno, este último en presencia de hierro da lugar al radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno, en conjunto con los fenil propanoides, pueden ser utilizados para reforzar las paredes celulares mediante la actividad de peroxidasas, además de entrecruzar a las proteínas ricas en hidroxiprolina o extensinas e incrementar las interacciones con polímeros de lignina.

También se encuentra documentado que la resistencia de las plantas a diferentes tipos de estrés, esta relacionada en la biosíntesis de metabolitos secundarios como los polifenoles, entre los que se encuentran flavonoides como la catequina, la cual posee propiedades antioxidantes y se ha observado como un buen sustrato para algunas oxidasas y peroxidasas. Las polifenol oxidasas son un grupo de enzimas que catalizan la actividad enzimática asociada a las polifenol oxidasas incluye a tres grupos de enzimas: a) cresolasas las cuales catalizan la oxidación de monofenoles a *o*-difenoles y/o *o*-dihidroxifenoles a *o*-quinonas, b) catecolasas o *o*-difenol oxigen oxidoreductasas y c) lacasas o *p*-difenol: oxigen oxidoreductasas. Los tres tipos de enzimas oxidan fenoles utilizando oxígeno molecular pero las lacasas, oxidan una amplia variedad de sustratos, incluyendo monofenoles, trifenoles, ácido ascórbico, al igual que *o*- y *p*- difenoles. Por su parte las fenol peroxidasas son enzimas que utilizan el peróxido de hidrógeno para oxidar una gran variedad de donadores de hidrógeno, como son compuestos fenólicos y participan en diferentes procesos fisiológicos de la planta, como son la lignificación, las suberización, el catabolismo de auxinas entre otros. La capacidad que presentan las polifenol oxidasas y las fenol peroxidasas, para formar o degradar el oxígeno y el peróxido de hidrógeno respectivamente, a expensas del consumo de fenoles y generar sustancias de color café en la superficie lesionada, es considerado como mecanismo de protección de la planta contra diferentes agentes estresantes.

De lo anterior deriva la importancia de estudiar el efecto que tiene una lesión por herida a nivel de los cotiledones de *Ipomoea purpurea*, minutos y horas después de realizada la lesión, sobre la actividad de catequin oxidasa, catequin peroxidasa y guayacol peroxidasa, las isoenzimas de cada una de ellas, la cantidad de fenoles y las especies reactivas de oxígeno.

1. ANTECEDENTES

I. *Ipomoea purpurea* (L.) Roth

La familia Convolvulaceas comprende aproximadamente 1700 especies agrupadas en 40 géneros. Se trata de una familia cosmopolita en cuanto a su distribución. Sus miembros son principalmente plantas tropicales con numerosos géneros endémicos. El género *Ipomoea* (*ips*: gusano y *homoios*: enrollarse) está compuesto por 500 especies, ampliamente distribuidas en regiones templadas a tropicales, especialmente en Norte y Sudamérica (Guillot, 2006).

Ipomoea purpurea se propaga de manera silvestre y en nuestro territorio nacional, se encuentra en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998). Se le conoce comúnmente como: gloria de la mañana, manto de María, Don Diego de día, campanilla morada, batatilla, bejuco, bejuquillo, quiebraplato, aurora, corregüela, mecapatlí, metlancasis, Xhail. Martínez en 1979, reportó para esta planta su clasificación (Fig. 1), así como su sinonimia botánica: *Pharbitis purpurea* (L.); Voigt, *Ipomoea hirsutula* (Jacq. f.), *I. hirta* Th. Dur., *I. mexicana* (A. Gray), *I. purpurea* var. *diversifolia* (Lindl.) O'Donell.

Reino:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Convolvulaceae
Género:	<i>Ipomoea</i>
Especie:	<i>purpurea</i> (L.) Roth



Fig. 1. Clasificación Botánica de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth, según Martínez (1979).

Ipomoea purpurea es una planta herbácea, rastrera o trepadora. Puede llegar a medir de 20 cm a 2 m de longitud. Su tallo se encuentra generalmente ramificado en su base, con pubescencias amarillas hasta de 4 mm de largo. Sus hojas presentan pecíolos de 4 a 20 cm de largo, láminas foliares en forma de corazón, ovadas, enteras o trilobadas, o bien, raramente 5 lobadas, de 3 a 17 cm de largo y 2 a 15 cm de ancho. Exhibe flores solitarias o dispuestas en cimas de 2 a 5 en las axilas de las hojas. La corola se encuentra en forma de embudo cuyo color va del púrpura, al rosa con el centro cambiando a un tono más claro hasta llegar al blanco. La base de la corola o tubo frecuentemente mide de 2.5 a 5 cm de longitud. El ovario es cónico con 6 óvulos en su interior. El estilo es de 1.4 a 2.7 cm de longitud y el estigma globoso. El fruto es una cápsula de 9 a 11 mm de diámetro con semillas en forma de gajo, de color café, café rojizo ó café oscuro de 2.2 a 3.7 mm de largo y 3.1 a 5 mm de ancho. Presenta hipocótilo cilíndrico, de hasta 100 mm. Cotiledones de lámina cuadrada a ampliamente ovada de 18 a 20 mm de largo y 8.5 a 20 mm de ancho y epicótilo cilíndrico, de 1 a 17 mm de largo. (Espinosa y Sarukhán, 1997; Rzedowski y Rzedowski, 2001). Éstos órganos permanecen asociados hasta los 22 días de desarrollo de la planta, siendo el único medio fotosintético durante los primeros 11 días que inicia la formación de la primera hoja verdadera (Díaz-Pontones, 1998).

Una gran cantidad de semillas de *Ipomoea purpurea* llegan a la madurez con alta viabilidad la cual llega a mantenerse entre 8 y 10 años, sin embargo en nuestro grupo de investigación se ha observado una viabilidad de hasta 17 años (Díaz-Pontones; comunicación personal). Asimismo las semillas de esta especie muestran alta capacidad germinativa de 95 a 98 % (Miller y Wilkin, 2001).

La información etnobotánica en los bancos de datos se relaciona con el empleo de esta planta para tratar espasmos, depresión, inflamación, diabetes y trastornos digestivos, además de ser utilizada como ornamento (Villaseñor y Espinosa, 1998).

A. *Ipomoea purpurea* como arvense

Ipomoea purpurea se encuentra ampliamente distribuida en cultivos básicos como el maíz y el frijol, entre 40 cultivos más. Por lo general, germina a partir de marzo a abril y ocasiona un decremento en la producción del cultivo que invade cuando no es controlada durante los primeros días. En el caso del maíz la infestación en este período, ocasiona plantas cloróticas de poco vigor y altura, de esta forma la reducción en el rendimiento alcanzan hasta un 22%; sin embargo las pérdidas se incrementan severamente cuando los períodos de competencia se extienden, o bien cuando la maleza emerge antes que el cultivar y su densidad de población es alta. En el frijol, el promedio de reducción en la productividad es de un 33%, hasta la pérdida total como consecuencia de los daños ocasionados por competencia (Agundis, 1984; Villaseñor y Espinosa, 1998).

Las técnicas utilizadas hasta el momento por los agricultores mexicanos para el control de las malezas, incluyen métodos como el mecánico-cultural (azadón, hoz, arado, fuego, anegamiento, sofocación y rotación de cultivos) y el químico (uso de herbicidas). Para erradicar a *Ipomoea purpurea* de los cultivos, se usa frecuentemente paraquat, éste herbicida provoca una respuesta de estrés en la planta, ya que genera desecación y colapso celular, ejerciendo de esta manera, una influencia negativa sobre el crecimiento del vegetal (Suárez y col., 2004).

II. ESTRÉS EN VEGETALES

Se considera estrés al cambio de cualquier factor ambiental, que actúe sobre el vegetal afectando su respuesta bioquímica y fisiológica, pudiendo provocar daños o lesiones. De acuerdo a la naturaleza del factor causante del estrés, se puede distinguir entre el estrés abiótico producido por condiciones ambientales y el estrés biótico causado por organismos vivos (Poschenrieder y col., 2006).

El estrés abiótico es causado por factores físico-químicos. Entre los factores físicos se encuentra el déficit hídrico, salinidad, temperaturas extremas, excesiva o insuficiente radiación luminosa, anaerobiosis por inundación, altas concentraciones de O₂, disminución de CO₂ en el ambiente, compactación del suelo, daño mecánico. Entre los factores químicos se incluyen el estrés nutricional, o la presencia de contaminantes inorgánicos (SO₂, NO, O₃, o metales pesados) u orgánicos como los clorofluorocarbonados (CFCs), bifenilos policlorados (BPCs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) ó herbicidas cuaternarios provenientes de amonio como el Paraquat, Diquat, Ciperquat (Poschenrieder y col., 2006).

Por otra parte las plantas se encuentran sometidas a estrés biótico cuando son atacadas por herbívoros, hongos, bacterias, virus, insectos, nemátodos, así como otras especies de plantas; produciendo un estrés que puede afectar y terminar con el ciclo de vida de la planta (Poschenrieder y col, 2006).

III. MECANISMO DE DEFENSA EN PLANTAS

A pesar de la naturaleza sésil y la ausencia de un sistema inmune, las plantas cuentan con mecanismos de defensa constitutiva e inducida. La defensa constitutiva opera en forma constante en la planta. Se basa en barreras físicas, estructurales y/o químicas, que conllevan la producción de una cubierta protectora en la superficie de los tejidos y hace uso de una gran diversidad de sustancias tóxicas para sobrevivir a los diversos cambios ambientales y/o contrarrestar las agresiones generadas por organismos herbívoros y patógenos. Otro mecanismo de defensa esta dado por la llamada respuesta de hipersensibilidad (HR, del inglés *hypersensitive response*), que implica una muerte celular localizada en el lugar de la lesión. A nivel celular, la activación de la HR incluye la producción de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y fuga de electrolitos, debido a la ruptura de membranas. En adición a esta respuesta de resistencia local, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa inducida, la cual aparece tiempo después de ocurrido algún tipo de daño. Esta reacción es muy específica, siendo severa a nivel local y poco agresiva a nivel sistémico (Gómez-Gómez, 2004). Conlleva el surgimiento de una “inmunidad sistémica” en donde las defensas locales establecen un estado de alta resistencia que se implementa en todo el organismo y protege a la planta de ataques subsecuentes. A este fenómeno se le llama resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés *systemic acquired resistance*), la cual reduce la severidad de los síntomas causados por un amplio espectro de patógenos y requiere de moléculas de señalamiento de tipo fenólico como el ácido salicílico (Croteau, Kutchan y Lewis, en Buchanan y col., 2000).

A. BARRERAS FÍSICAS

La célula vegetal secreta en su superficie un conjunto de polisacáridos, proteínas y otros compuestos que se ensamblan en una estructura polimérica compleja, externa a la membrana plasmática: la pared celular (Sormeville y col., 2004). La pared celular esta constituida por la celulosa, el polímero principal de las paredes, el cual representa su componente fibrilar, conformado por cadenas lineales de glucosas unidas de manera covalente por enlaces glicosídicos de tipo β (1 \rightarrow 4), a través de enlaces hidrógeno intermoleculares varias cadenas adyacentes de celulosa (60-70) se combinan formando microfibrillas y alrededor de 30 microfibrillas se reúnen para formar una fibra cuyo diámetro es típicamente de unos 3 nm (Saxena y Brown, 2005). Las fibras de celulosa se encuentran asociadas con carbohidratos no fibrilares a los que se les denomina hemicelulosas, los cuales son un grupo heterogéneo de polisacáridos cuya estructura general esta constituida por una cadena lineal β (1 \rightarrow 4) de un azúcar, desde la que se ramifican cadenas laterales cortas de otros azúcares (O'Neill y York, 2003). Las pectinas son un grupo complejo y heterogéneo de polisacáridos ramificados y muy hidratados, cuyo componente más relevante es el ácido D-glucurónico y D-galacturónico (Cosgrove, 2005). Entrelazadas con las hemicelulosas existen las glucoproteínas de tipo estructural, las cuales son ricas en aminoácidos serina e hidroxíprolina, que se acumulan en la pared celular en diferentes etapas de desarrollo en respuesta a distintas condiciones de estrés (José-Estanyol y Puigdomenéch, 2000).

Durante la formación de la pared celular secundaria, así como resultado de diversos factores bióticos y/o abióticos, aparecen sustancias adicionales que no afectan la apariencia de las células pero si las propiedades fisico-químicas de la pared celular, impidiendo la difusión de gases como oxígeno y dióxido de carbono, así como el agua. Entre estas modificaciones está la producción de suberina, cutina, ceras, lignina y mineralización de las paredes celulares. La suberina es un polímetro insoluble de unidades monoméricas de hidroxí- o epoxi- ácidos grasos unidos por uniones éster, ligados de manera covalente a compuestos fenólicos, se presenta principalmente en las células

de la epidermis y está asociada con las células del súber o corcho de la peridermis, también se forma suberina en áreas dañadas por heridas, en los sitios de abscisión de las hojas, así como en las bandas de Caspari de la endodermis de la raíz (Franke y Schreiber, 2007). La cutina esta compuesta por largas cadenas de ácidos grasos, que están unidos entre si por enlaces éster, creando una capa rígida llamada cutícula, la cual es formada y secretada por las células de la epidermis de la planta. Asociada a la cutina se encuentran las ceras, que son ésteres de ácidos grasos con alcoholes, altamente insolubles que suelen depositarse por encima de la cutícula. Al igual que la suberina, la cutina y las ceras evitan la pérdida de agua por evaporación y protegen a la planta de las agresiones del ambiente (Taiz y col., 2006). La mineralización de las paredes, consiste en la impregnación con sales inorgánicas como la sílice, el carbonato de calcio y el oxalato de calcio, para endurecer estructuras como por ejemplo la epidermis de las hojas de las gramíneas (Jetter y col., 2006).

La lignina (*lignum*, madera) es una molécula formada por una condensación de unidades fenólicas, que se entrelaza en una red tridimensional alrededor de las microfibrillas de celulosa por la acción de enzimas que se encuentran en la pared celular. Se compone de tres unidades del tipo fenilpropano alcohol trans- coniferilico (tipo guayacil), alcohol sinapilico (tipo siringil) y alcohol trans-p-coumarilico (tipo p-hidroxifenil). Su función principal es aumentar la impermeabilidad y la rigidez de la pared celular. De acuerdo a la especie de planta dependerá el tipo de componte mayoritario de la lignina, por ello cuando esta es sometida a hidrólisis ó pirólisis, puede producir derivados del guayacol (2-metoxifenol), fenoles, benzoatos, p-hidroxibenzoatos, p-cumaratos, cinamato, ferulato, catecoles y trazas de benceno mediante homólisis del enlace β -O-4. El guayacol (o-metoxifenol ó metilcatecol) es un compuesto fenólico, incoloro y aromático usado frecuentemente como sustrato para medir la actividad enzimática de fenol peroxidasas. Sus componentes intermediarios son la vainillina y el ácido vainillico (Fig. 2). Presenta coloración oscura en presencia de luz, de oxígeno o derivados de éste (Boudet, 2003).

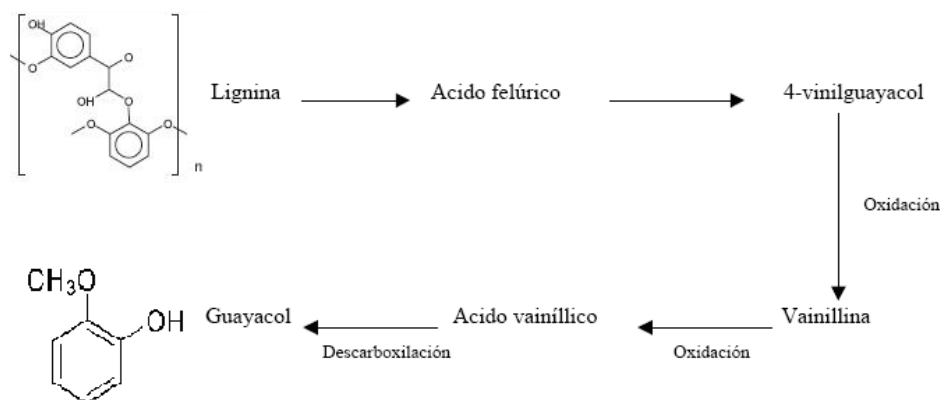


Fig. 2 Esquema general de la degradación química ó térmica de la lignina hasta la formación de guayacol (González y col., 2004)

B. METABOLITOS SECUNDARIOS

La base fisiológica y bioquímica de la resistencia de plantas se encuentra relacionada con la biosíntesis de metabolitos secundarios. Se llama metabolitos secundarios a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que no intervienen en su metabolismo primario. La mayoría de los metabolitos secundarios actúan como agentes alelopáticos, fitoalexinas, sustancias astringentes y como atractores polínicos. Entre estos compuestos fitoquímicos se encuentran los alcaloides, fenoles simples, polifenoles y terpenoides. Dentro del grupo de los polifenoles se encuentran los

flavonoides, quienes desempeñan un papel muy importante durante los mecanismos de defensa ante herbívoros, patógenos y daño mecánico (Croteau, Kutchan y Lewis; en Buchanan y col., 2000).

1. Flavonoides

La palabra flavonoide proviene del latín *flavus*, amarillo. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), formado por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a un anillo C de pirano (heterocíclico). La introducción de grupos OH en los anillos de benceno, les confiere excelentes propiedades quelantes sobre el hierro y otros metales de transición, por lo que poseen una gran capacidad antioxidante, ya que atrapan el oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (Martínez y col., 2002).

Se han descrito aproximadamente más de 6000 flavonoides diferentes, los cuales algunos autores han subdividido en 6 diferentes clases según la oxidación a nivel del anillo de carbono: chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas y taninos (Lepiniec y col., 2006). Se ha añadido una séptima clase de flavonoides: las auronas, tomada en cuenta por estar presentes en una cantidad considerable de plantas (Taiz y col., 2006).

Con base en su origen químico, los taninos se clasifican en hidrolizables y condensadas. Los taninos hidrolizables son polímeros de ácidos fenólicos (gálico, hexahidroxidifénico). Las protoantocianidinas (PAs) o taninos condensados son polímeros flavan-3-oles. Cumplen un papel importante en la modulación de los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico (Taiz y Zeiger, 1998; Dixon, 2005). Poseen una importante función de defensa contra bacterias, hongos y ciertos herbívoros, debido a la astringencia que presentan, la cual se atribuye a la capacidad que tienen estos compuestos de interactuar fuertemente con proteínas y formar precipitados, mediante la oxidación de los fenoles a sus formas quinona. Dicho proceso en los herbívoros ocurre en el interior de los intestinos, ocasionando un impacto negativo en su nutrición (Hagerman y Butler, 1981).

La estructura de los taninos condensados es variable, dependiendo de la estereoquímica y del patrón de hidroxilación de las subunidades de flavan-3-ol. Las subunidades más frecuentes constituyen la catequina y la epicatequina o galocatequina, las cuales están unidas por enlaces carbono-carbono (Schofield et al., 2001).

Recientemente, se han caracterizado las enzimas que actúan en las dos vías de biosíntesis de las protoantocianidinas condensadas: la leucoantocianidin reductasa (LAR) que sintetiza a *trans* flavan-3-ols [catequina (2-3-*trans*)] y antocianidin reductasa (ANR) que sintetiza a *cis* flavan-3-ols [epicatequina (2-3-*cis*)]. En la figura 3, se muestra la ruta de biosíntesis de las unidades flavan-3-oles, las cuales se forman por reducción de flavan-3-4 dioles tales como leucoprodelfinidina o leucocianidina, seguida por una etapa de condensación para conformar los oligómeros o polímeros (Lepiniec y col., 2006).

Las catequinas se obtienen de la hidrólisis de protoantocianidinas y se ha observado que son un buen sustrato para algunas oxidasas y peroxidasas (Kinsella y cols, 2003). Están formadas por 15 átomos de carbono y contienen dos núcleos fenólicos (anillos A y B) que están unidos por tres átomos de carbono que forman parte, junto con un átomo de oxígeno, del anillo C. Los carbonos 2 y 3 del anillo C son asimétricos y según la posición espacial de los sustituyentes del carbono 3, las catequinas pueden ser enantiómeros positivos o negativos (Fig. 4); (Yamamoto y col., 1997). Dichos enantiómeros se encuentran presentes en las semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas, los cuales al oxidarse adquieren su color café característico (Lepiniec y col., 2006).

Se han definido dos catequinas diferentes (Fig. 4) con tres sustituciones distintas cada una, al extraer los polifenoles con etilacetato, siendo las mayoritarias el (-)-galato de epigalocatequina (EGCG) y (+)-galocatequina (GC); (Lill y col., 2003). Poseen efecto antioxidante, el cual se atribuye a su acción quelante de metales en transición y de radicales libres mediante la formación de estructuras menos reactivas (Taiz y col, 2006).

Los flavonoides pueden actuar como sustancias aleloquímicas en las plantas y tener efecto directo o indirecto sobre otros vegetales. El tipo, cantidad y localización de estas sustancias varía en función de la especie de planta, la etapa de desarrollo de los tejidos y puede ser modulada por señales ambientales. Sin embargo se ha reportado la producción de flavonoides en hojas, tallos y raíces como consecuencia de herbivoría. En otros casos las hojas y restos vegetales que contienen sustancias alelopáticas, caen al suelo y al descomponerse liberan compuestos tóxicos que pueden ser degradados por la actividad microbiana hasta otros compuestos que, incluso, pueden llegar a ser más dañinos que las sustancias de origen (Igartuburu, 2000)

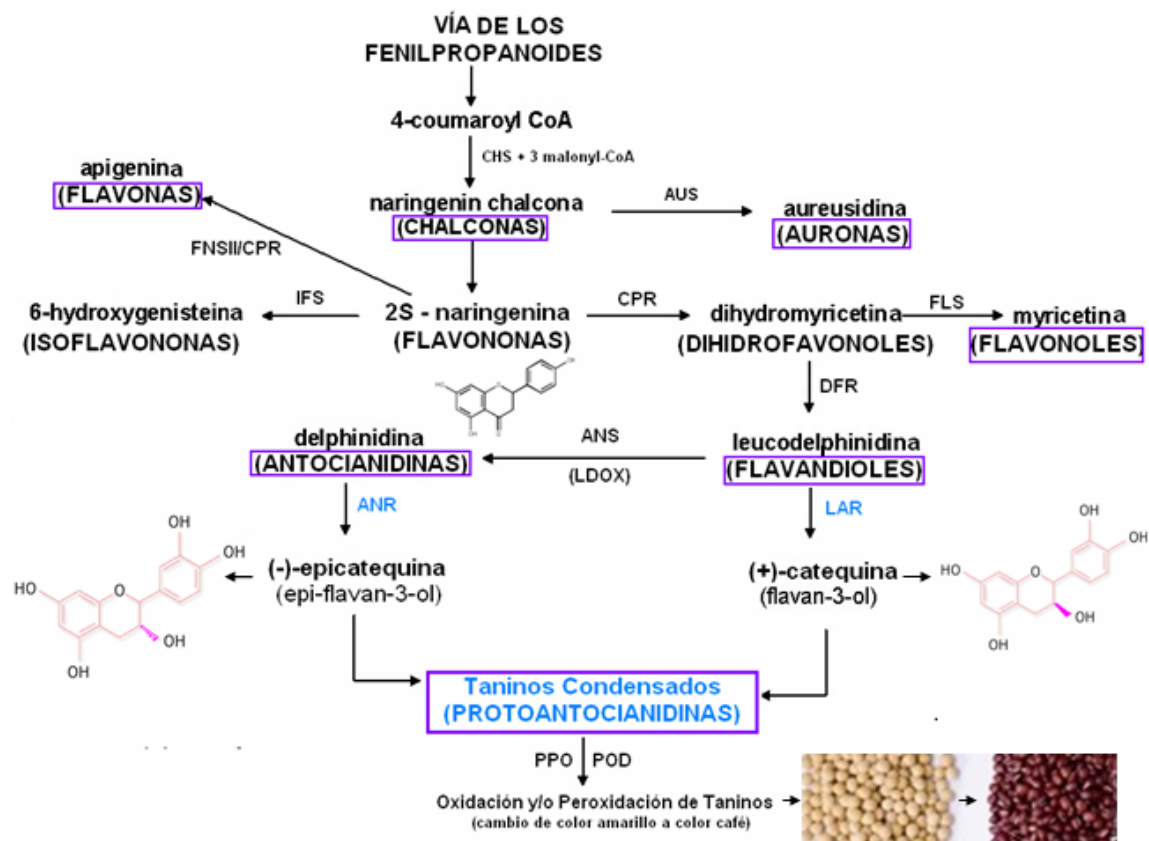


Fig. 3: Biosíntesis de Flavonoides. En los recuadros color violeta se señala cada una de las siete clases de flavonoides. Se muestra a la leucocianidin reductasa (LAR) y a la antocianidin reductasa (ANR), enzimas que dan lugar a las catequinas y epicatequinas respectivamente, compuestos de interés para este trabajo (Basado en Lepiniec y col., 2006).

Otra función importante de los flavonoides es actuar como fitoalexinas, por ejemplo la pisatina, la faseolina y la gliccolina I, los cuales son compuestos antimicrobiales de bajo peso molecular producidos por las plantas en respuesta a infección, a agentes químicos, a daño mecánico o estrés inducido por altos niveles de radiación ultravioleta y descenso de temperatura. Se sintetizan en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos, como en

tejidos susceptibles a la necrosis, es decir se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar de lesión (García y Pérez, 2003). Se sabe que la herida en una planta producto de un herbívoro, induce la producción de etileno y metil-jasmónico, esta liberación causa la sobreproducción de fitoalexinas, una respuesta sistémica, entre las fitoalexinas que se inducen están los monfenoles, la lignina, los taninos, así como la inducción de enzimas como las fenol peroxidasas y polifenol oxidasas (Held, 1999).

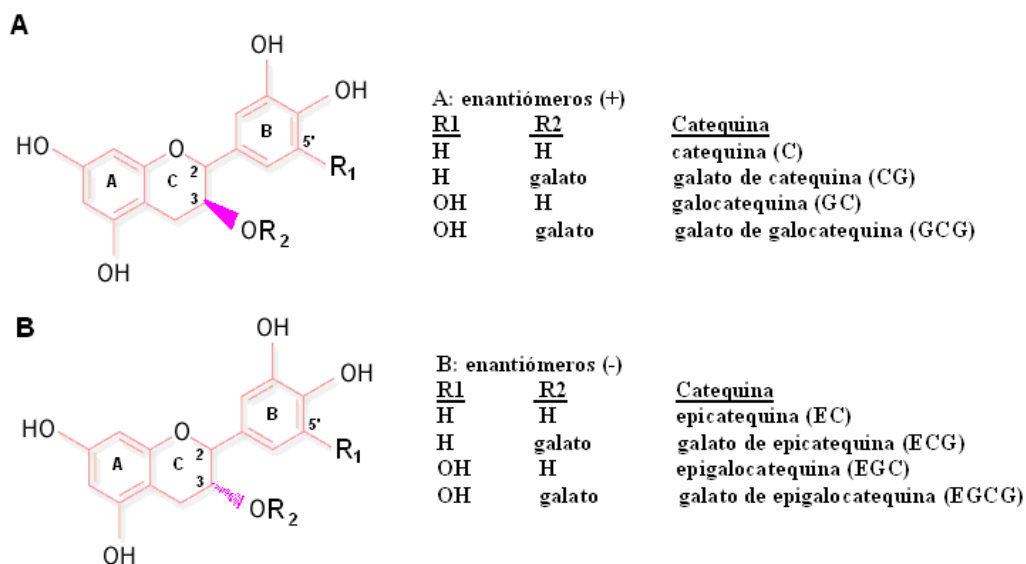


Fig. 4: Estructura química de las catequinas (Modificado de Lill y col., 2003)

IV. ENZIMAS OXIDANTES DE FENOLES

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son hemoproteínas, excepto la glutatión peroxidasas, que es una selenoproteína. Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido (Buchanan y col., 2000). La gran afinidad por el H_2O_2 , se debe a que éste se puede unir al hierro del grupo hemo por los dos planos del centro activo, dando lugar a una inhibición por exceso de sustrato ya que cuando ambas posiciones están ocupadas por el H_2O_2 y no es posible la unión del otro sustrato (Hansberg, 2002).

Las fenol peroxidasas (POD) tienen la capacidad de formar o degradar el H_2O_2 a expensas del consumo de sustancias de tipo fenólico, generando sustancias de color café, razón por la cual ha sido ubicada dentro del sistema enzimático antioxidante (Hansberg, 2002). Las peroxidasas y las polifenoloxidasas, catalizan la oxidación de fenoles propios de las células a quinonas, las cuales son altamente reactivas con proteínas, ácidos nucleicos, flavonoides y otros quinonas (Ruuhola y col., 2007).

Las polifenoloxidasas (PPO; EC 1.14.18.1) son cuproenzimas las cuales han sido clasificadas en tres grupos: a) cresolasas las cuales catalizan la oxidación de monofenoles a *o*-difenoles y/o *o*-dihidroxifenoles a *o*-quinonas, b) catecolasas o *o*-difenol oxigen oxidoreductasas y c) lacasas o *p*-difenol: oxigen oxidoreductasas. Los tres tipos de enzimas oxidan fenoles utilizando oxígeno molecular pero las lacasas, oxidan una amplia variedad de sustratos, incluyendo monofenoles, trifenoles, ácido ascórbico, al igual que *o*- y *p*- difenoles (Ruuhola y col., 2007). Su pH óptimo

oscila entre 5 y 8, aunque varía dependiendo del tipo de polifenoloxidasas y del sustrato. Las PPO presentan en su centro activo dos átomos de cobre, unidos cada uno de ellos a tres histidinas. En su entorno se sitúan una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes en su actividad, para la unión de los sustratos (Croteau, Kutchan y Lewis.; en Buchanan y col., 2000).

Las PPO son de gran importancia en las plantas, por su participación en la oxidación del ácido indolacético, la síntesis de lignina por la acción de la *p*-difenoloxidasas, y la resistencia al estrés biótico y abiótico. Su actividad aumenta cuando existe senescencia de tejidos, o bien, cuando la planta sufre daño mecánico. En este último caso, al ocurrir la ruptura de células, las PPO, interactúan con los sustratos fenólicos y en presencia de oxígeno catalizan la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles (Ruuhola y col., 2007). Posteriormente los ortodifenoles son oxidados a ortoquinonas, las cuales se polimerizan. Estas forman melaninas (pigmentos que presentan color marrón, rojo o negro) en la superficie de lesión. Por tanto, se postula que su función principal en las plantas es actuar como un mecanismo de defensa (Hachinohe y Matsumoto, 2007).

El control natural de la actividad de la polifenoloxidasas se produce fundamentalmente mediante la compartimentación de los sustratos, cuando estos compartimentos se rompen por un daño mecánico, como el triturado, corte, congelación y descongelación, se lleva a cabo la oxidación de la tirosina u otros fenoles, lo cual provoca la reacción de pardeamiento en la planta (Mayer, 1987). Algunos agentes reductores como el ácido ascórbico y el α -tocoferol pueden actuar revertiendo la reacción, de quinonas a fenoles. También pueden actuar directamente sobre el centro activo del enzima, transformando el cobre $2+$ en cobre $1+$, que se disocia más fácilmente. El ácido benzoico y otros compuestos aromáticos, actúan reduciendo la actividad de las PPO, al competir con los sustratos (Hachinohe y Matsumoto, 2007).

V. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA RESPUESTA DE DEFENSA

Hasta el momento, se ha descrito como las plantas responden al estrés biótico y abiótico mediante diversas estrategias coordinadas de resistencia mediadas por diferentes rutas de señalización bioquímica. La rapidez y la extensión de la respuesta a estas señales intracelulares, determina finalmente el que la planta pueda superar satisfactoriamente al estrés (Radman y col., 2003). Inicialmente, cuando una célula de la planta sufre una lesión causada por daño mecánico, herbivoría o por algún patógeno, se puede desencadenar una respuesta de hipersensibilidad que induce una producción de peróxido de hidrógeno, fitoalexinas y/u otros compuestos. Esta reacción también puede propiciar la aparición de resistencia sistémica, que es efectiva en sitios distantes del punto de lesión. Esta respuesta, también puede ser una consecuencia de la colonización de las plantas por microorganismos no patógenos o de tratamientos con inductores químicos tales como el ácido isonicotínico, el ácido salicílico y el ácido jasmónico (Kim y col., 2001).

Se ha demostrado que la respuesta de HR y la SAR está mediada por diferentes vías de transducción de señales; así como por diferentes rutas como la asociada y dependiente de SA, la ruta independiente de SA, y la ruta ligada al ácido jasmónico (JA) y al etileno. La ruta dependiente de SA permite el desarrollo de la SAR y la expresión de genes que codifican proteínas de defensa, denominadas proteínas PR. La ruta ligada al JA y etileno, conduce a la expresión de genes que codifican proteínas denominadas defensinas, tioninas o proteínas antimicrobianas (AMP), inhibidores de proteasas y otras proteínas PR (proteínas de defensa) no inducidas por SA. Ambas rutas se entrecruzan y pueden inducir compuestos o proteínas de defensa comunes (Kuc'J, 2001).

Otros estudios demuestran que no existe sobreposición de las vías inductoras de SA y JA, además de que existen efectos antagónicos entre la aplicación de SA y la producción de una herida y/o la aplicación de JA y los genes inducidos por este último (Penacortes y col., 1993; Doares y col., 1995). Por otra parte el estudio de Thaler y col. (2002) resume las respuestas de la planta ante la presencia del SA y el JA: 1) existe un antagonismo entre las vías de señalamiento del SA y del JA en ensayos bioquímicos (aplicación de la fitohormona) y/o en ensayos biológicos (herbivoría por insecto); 2) el tiempo de inducción influye en la respuesta química y biológica cuando se aplican simultáneamente ambos inductores (SA y JA/herbívoro) dándose una interacción negativa; 3) la concentración del inductor es importante para determinar la atenuación química de la contravía, en donde altas concentraciones muestran una interacción negativa de la señal; 4) la separación temporal y/o bajas concentraciones del inductor (SA y JA) pueden reducir la señal negativa de la interacción; 5) la interacción negativa se observa más constante en ensayos biológicos que en los químicos. Dependiendo de la lesión, el tipo de compuestos de defensa sintetizados por la planta puede variar predominando los inducidos por la vía de SA, o por la de JA y etileno. En cualquier caso, el resultado es la inducción en forma sistémica de compuestos de defensa que incluyen glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HyP), relacionadas con el reforzamiento de la pared celular; así como inducciones de enzimas involucradas en la síntesis y uso de los fenilpropanoides: fenilalanina amonio liasa, fenolperoxidasas y polifenoloxidasas entre otras (Kuc'J, 2001).

Recientemente se propuso que la inducción de resistencia sistémica, es causada por el aumento de oxidación y peroxidación de compuestos fenólicos en el sitio de lesión. Estas reacciones son catalizadas por polifenoloxidasas y fenolperoxidasas, y producen semiquinonas, quinonas y especies reactivas de oxígeno (ERO); los cuales pueden tener efectos tóxicos y/o propiedades repelentes contra estrés biótico provocado por herbivoría (Ruuholta y col., 2007).

VI. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los radicales libres se forman cuando una molécula con un par de electrones no apareados en la órbita externa recibe o pierde un electrón. La molécula más común que forma radicales libres es el oxígeno. El oxígeno molecular (O_2) es fundamentalmente birradical ya que tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo ($2p_y$ y $2p_z$), ambos con el mismo giro paralelo, impidiendo que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones que interviene. Aproximadamente del 2% del oxígeno es reducido en forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, por lo que origina compuestos intermedios inestables, llamados especies reactivas de oxígeno (Buchanan y col., 2000). Cuando el oxígeno recibe un exceso de energía se produce un singulete de oxígeno ($1O_2$), una molécula altamente reactiva, que puede transferir su energía a otras moléculas biológicas o reaccionar con ella misma, produciendo endoperóxidos o hidroperóxidos. La distribución particular de los electrones de cada molécula de oxígeno diatómico puede aceptar cuatro electrones y cuatro protones, produciendo dos moléculas de agua. Si la molécula de oxígeno sólo recibe uno, dos o tres electrones, se forman las especies reactivas de oxígeno, como los radicales superóxido y peróxido, así como peróxido de hidrógeno (Fig. 5). El radical superóxido (O_2^{\ominus}) reacciona reduciendo quinonas y complejos de metales de transición Fe-Cu, afectando la actividad de las enzimas que contienen estos metales. El O_2^{\ominus} no atraviesa la membrana plasmática, por tanto es dismutado rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los radicales hidroperóxido se forman a partir del radical superóxido por protonación; en solución acuosa, pueden atravesar la membrana y sustraer átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados iniciando una autooxidación de lípidos. El H_2O_2 es una molécula moderadamente reactiva se difunde fácilmente a través de membranas, lo que evidencia su función como segundo mensajero intra o intercelular. El H_2O_2 pueden originar radicales hidroxilo ($^{\circ}OH$), que son los principales agentes oxidantes de las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, fenoles y azúcares (Moller y col., 2007).

Los principales derivados del oxígeno detectados en la respuesta de hipersensibilidad, son O_2^{\bullet} , H_2O_2 y $^{\bullet}OH$, que se producen en el apoplasto de la célula. Se considera que la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática, es la enzima causante de la mayor producción de ERO en condiciones de estrés biótico y/o abiótico; otro mecanismo de producción se encuentra en los procesos de transferencia de energía en la cadena respiratoria de la mitocondria, fotosíntesis y/o fotorespiración en los cloroplastos y peroxisomas de la célula vegetal (Apel y Hirt, 2004). Asimismo se ha reportado que el Ca^{2+} es capaz de activar directamente a la NADPH oxidasa *in vitro*, ya que esta proteína posee 2 dominios de unión al Ca^{2+} , en la región N-terminal (Sagi y Fluhr, 2001). Además de que las oxidasas y peroxidasas de la pared celular pueden mediar la producción apoplástica de ERO; la cual no siempre es nociva para las células, ya que inducen diversas respuestas asociadas a la diferenciación, proliferación y muerte, de tal forma que en concentraciones adecuadas funcionan como segundos mensajeros (Moller y col., 2007).

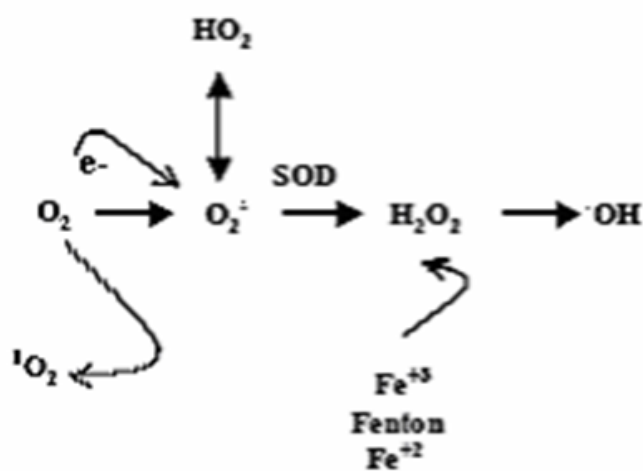


Fig. 5: Interconversión de ERO, derivadas de O_2 . El estado basal de oxígeno molecular puede activarse por energía, formando un singulete de oxígeno (1O_2). Alternativamente, la reducción por un electrón lleva a formar el radical superóxido O_2^{\bullet} . El superóxido existe en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroxiperoxilo (HO_2^{\bullet}). Después los siguientes pasos de reducción forman peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y agua (H_2O). Los iones de metales que están presentes en las células en forma oxidada (Fe^{3+}) se reducen en presencia de O_2 , y pueden catalizar la conversión de H_2O_2 a $^{\bullet}OH$, por la reacción de Fenton o Haber-Weiss (Basado en Moller y col., 2007).

La generación de ERO ocurre en dos fases (Fig. 6): fase I o fase inicial transitoria que sucede minutos después de una lesión por daño mecánico, herbivoría o ataque de patógenos; y una fase II o fase persistente la cual es de mayor amplitud y comienza de una a tres horas después que la fase inicial ha terminado. Durante la primera hora después de provocada la lesión, se observa un aumento en la producción de ERO en la fase inicial transitoria. Sin embargo después de este tiempo, si no se cuentan con sustancias antioxidantes como fenoles, así como enzimas que puedan ocupar a estos compuestos como sustratos, se presenta una acumulación de ERO en el área lesionada; mientras que en presencia de enzimas y compuestos fenólicos con actividad antioxidante, los niveles de ERO se mantienen bajos en el sitio de lesión (Mittler y col., 2004).

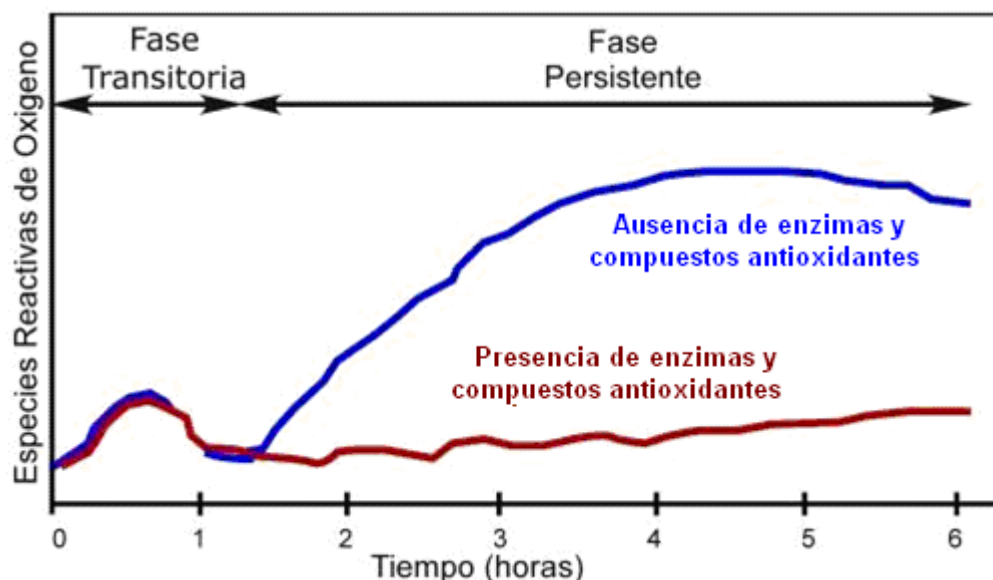


Fig. 6. Producción Bifásica de ERO en respuesta a daño mecánico, herbivoría ó patógenesis (Modificado de Mittler y col., 2004)

A. MECANISMOS DE DESTOXIFICACIÓN DE RADICALES LIBRES

Existen sistemas de destoxificación de ERO a nivel celular (Tabla 1), en donde actúan enzimas como: la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) que dismuta los superóxidos a H_2O_2 y O_2 y la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) que convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 . El H_2O_2 también puede ser usado por la guayacol peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) y por la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) generando tetrahydroguayacol y dehidroascorbato respectivamente más H_2O (Vranová y col., 2002). Las enzimas anteriormente mencionadas así como otros compuestos como el ascorbato, los carotenoides, el glutatión y el tocoferol ayudan a precisar el lugar de acción de las cascadas de transducción de señales derivadas de ERO, para que se lleve a cabo el fortalecimiento de la pared celular (Greenberg y Yao, 2004).

Además existen otros mecanismos de destoxificación de ERO, mediante quelantes ó también llamados “atrapadores”, los cuales pueden ser naturales como la adenina y el piruvato de sodio; también se han diseñado atrapadores de ERO sintéticos para fines de investigación como el methimazol y el DPI (Tabla 2). Estos atrapadores actúan disminuyendo la tasa de oxidación de los radicales libres, ya que pueden aumentar su velocidad de hidrólisis o impedir su formación ya que compiten por el mismo sustrato que las enzimas productoras de ERO como la NAD(P)H oxidasa a nivel del apoplasto y algunas peroxidasas de la pared celular del vegetal. Por tanto los atrapadores de radicales libres interfieren en diferentes puntos de la reacción: $O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow \cdot OH$ (Liszky y col., 2004).

Tabla 1. Localización en la célula vegetal de las enzimas y compuestos que permiten la defensa contra la oxidación

Enzimas	Localización en la Célula Vegetal					
	Apoplasto	Citoplasma	Cloroplasto	Mitocondria	Peroxisoma	Vacuola
Ascorbato peroxidasa		*	*			*
Catalasa		*		*	*	
Cu/Zn-SOD		*	*		*	
Denidroascorbato reductasa		*	*			
Glutación peroxidasa						*
Glutación reductasa		*	*	*		
Mn-SOD		*	*	*		
Monodehidroascorbato reductasa				*		
Compuestos						
Peroxidasa	*	*				
Ascorbato	*	*	*			
Carotenoides			*			
Glutación		*	*	*		
Tocoferol			*			

Cu-Zn- SOD = Superóxido Dismutasa dependiente de Cobre-Zinc

Mn-SOD = Superóxido Dismutasa dependiente de Manganeseo

(Modificado de Lambeth, 2004).

Tabla 2: Queladores ó “atrapadores” de O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$, ó inhibidores de NAD(P)H oxidasa y peroxidasas

Queladores o “atrapadores”	EROs			Inhibidores de	
	O_2^-	H_2O_2	$\cdot OH$	NAD(P)H oxidasa	Peroxidasas
Adenina (3mM) ^o			*		
Na-benzoato (3mM) ^o			*		
Na-salicilato (1mM) ^o			*		
His (30mM) ^o			*		
Mn-DFA (10mM) ^o	*				
CuCl ₂ (30 μ M) ^o	*				
Tiron (10 mM) ^o	*				
SOD (100 μ g mL ⁻¹) ^o	*				
Mn-TMP ^a (100 μ M) ^o	*				
Na-piruvato (30 mM) ^o		*			
KI (30 mM) ^o		*			
DPI ^b (50 μ M) ^o				*	
ZnCl ₂ (10 mM) ^o				*	
KCN ^c (1Mm) ^o					*
NaN ₃ (0.3 mM) ^o					*
NH ₂ OH (1 mM) ^o					*
SHAM (3mM) ^o					*
ABAH (3Mm) ^o					*
Methimazol (10mM) ^o					*

^o Concentraciones frecuentemente usadas en raíz de maíz.

(Modificado de Liskay y col., 2004)

B. INTERACCIÓN DE EROS CON OTRAS SEÑALES

El ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (AJ) y el óxido nítrico (NO), son otros importantes reguladores de la respuesta causada por daño mecánico, herbivoría o por patógenos (Fig. 7). La interacción con estas u otras señales puede explicar las funciones divergentes de las ERO en las respuestas de defensa (Durrant y Dong, 2004).

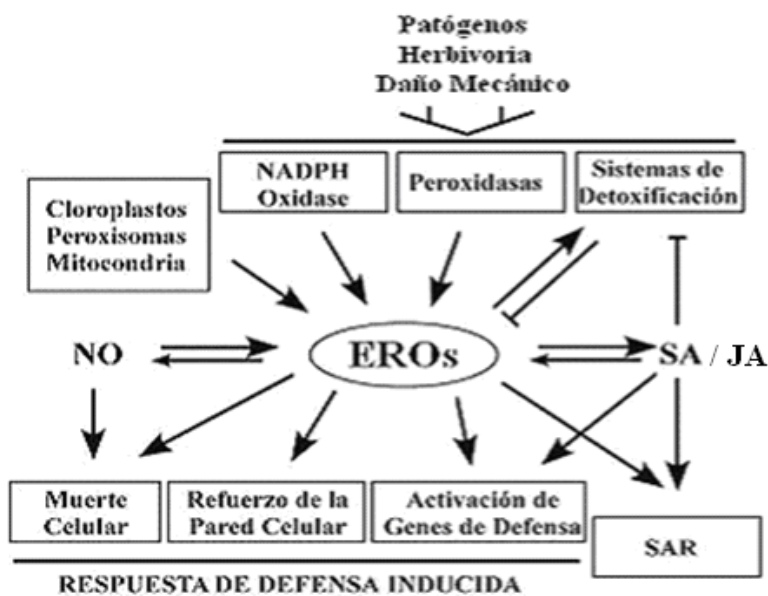


Fig. 7. Producción de ERO y funciones en la respuesta a daño mecánico, herbivoría o patógenos. SA: ácido salicílico, SAR: respuesta sistémica adquirida, NO: óxido nítrico. (Modificado de Durrant y Dong, 2004)

La acumulación de ERO en las células donde se ha producido algún tipo de daño, indica que estas moléculas, actúan como señales regulando el establecimiento de la reacción de defensa a nivel de la expresión génica, o el fortalecimiento de la pared celular vía entrecruzamiento de proteínas de la pared (Apostol y col., 1989; Babor, 1992; Blechert y col., 1995). En rutas de transducción de señales inducidas por estrés biótico y abiótico, las ERO participan en la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), en el cambio en los niveles de Ca^{2+} , y en la modificación del estado redox celular (Rentel y Knight, 2004). En las plantas el estado redox regula a NPR1, un activador esencial de las respuestas de defensa que dependen del ácido salicílico. NPR1 se acumula en el citosol como un oligómero inactivo mantenido así por enlaces disulfuro, después de la estimulación su reducción libera unidades monoméricas que migran hacia el núcleo e interactúan con el factor de transcripción reducido TGA1, el cual a su vez activa la expresión de genes de defensa dependientes de ácido salicílico (Mou y col., 2003). Así la cascada de señalización activada por ERO inicia un cambio global en el transcriptoma para ejecutar programas genéticos apropiados (Bolwell y col., 1995).

En células de *Arabidopsis* tratadas con H_2O_2 se observaron cambios en el perfil de expresión de 175 genes (de 11,000 analizados). Estos genes codifican para enzimas antioxidantes, proteínas asociadas con la defensa o con funciones de señalización tales como cinasas o factores de transcripción (Desikan y col., 2001). La rápida producción de ERO y la capacidad de difusión del H_2O_2 a través de membranas ha hecho pensar que esta molécula puede actuar como segundo mensajero intra o intercelular (Pitzschke y Hirt, 2006; Van Breusegem y Dat, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

Ipomoea purpurea es una arvense que se encuentra ampliamente distribuida e infesta alrededor de 40 cultivos básicos para la alimentación humana entre los más importantes se encuentran el maíz y el frijol. Compite por agua, luz solar, nutrimentos y bióxido de carbono, lo cual implica que en México anualmente se presente un decremento que va del 33% hasta la pérdida total en la producción del cultivo que invade (Agundis, 1984; Villaseñor y Espinosa, 1998).

Las hojas cotiledonarias en *Ipomoea purpurea* son fundamentales para la sobrevivencia y el establecimiento de la planta, puesto que dichas estructuras capturan los compuestos de la hidrólisis de las reservas del endospermo, y las almacenan temporalmente como almidón, sacarosa, monosacáridos, proteínas; los cuales son translocados posteriormente al resto de la plántula durante las primeras fases de post-germinación, probablemente para el metabolismo primario y crecimiento (García-Lara, 1998). Observaciones de campo demuestran que los cotiledones sufren constantes agresiones por daño mecánico, herbivoría y patogénesis durante la post-germinación temprana; si en presencia de éstas condiciones físicas y biológicas adversas sufren daño, puede provocarse una disminución del vigor e incluso la muerte de la plántula, ya que los cotiledones son los primeros órganos fotosintéticos. Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que la emergencia de la primera hoja verdadera ocurre alrededor de los 11 días después de iniciada la embibición y los cotiledones senescen a partir de los 11 días, encontrándose restos hasta los 22 días de iniciada la embibición (Díaz-Pontones y col., 1998). Dado los tiempos entre la protusión de la radícula (18 hr) y la emergencia de la primera hoja verdadera (más de 11 días), los gastos metabólicos deben ser aportados por las reservas y de la síntesis de *novo* que realicen los cotiledones durante esta etapa; lo que implica que los cotiledones deben de encontrarse altamente protegidos contra el daño mecánico, ataque de herbívoros y patógenos. Por tanto estos órganos pueden tomarse como modelo biológico, para estudiar los mecanismos intrínsecos de defensa de la planta, lo cual posibilita encontrar factores de regulación claves para la sobrevivencia de esta arvense, y en un futuro poder diseñar estrategias de control para esta especie de maleza, así como acercarnos a una mejor comprensión de los mecanismos de regulación de defensa en plantas silvestres.

Debido a la importancia que pudiera tener la generación y regulación de especies reactivas de oxígeno cuando se provoca una lesión en la planta; resulta relevante estudiar la relación que existe entre especies reactivas de oxígeno y el aumento en la actividad de enzimas que los pueden regular, como las peroxidadas y las polifenoloxidasas, así como la acumulación de compuestos antioxidantes (fenoles), lo cual pudiese explicar las funciones divergentes de las ERO en diferentes fenómenos de defensa.

3. HIPÓTESIS

A. HIPÓTESIS GENERAL

Si la generación de una herida en los cotiledones de *Ipomoea purpurea* puede desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), entonces éstas pueden servir como moléculas de señalización para promover la síntesis de enzimas como la catequin oxidasa, catequin peroxidasa, guayacol peroxidasa y la acumulación de fenoles después de un daño mecánico a tiempos cortos y largos de recuperación.

B. HIPÓTESIS PARTICULARES

1. Si el daño mecánico puede generar ERO a tiempos cortos de recuperación, por tanto una herida en los cotiledones a tiempos menores de dos horas debe acumular una suficiente cantidad de ERO que pueda ser detectada por métodos cuantitativos, así como poder determinar su localización.
2. La generación de una herida en un órgano fundamental como lo es el cotiledón, puede desencadenar un desequilibrio en la homeostasis de la planta, por tanto es posible que 24 horas después del daño mecánico en los cotiledones, se genere un aumento en la actividad de enzimas como catequin oxidasa, catequin peroxidasa, guayacol peroxidasa en forma diferencial, las cuales a su vez pueden presentar distintos tipos de isoenzimas. Asociado a esto podría llevarse acabo la síntesis de *novo* de fenoles, y en consecuencia provocar niveles altos polifenoles de tipo condensado; por lo que se esperaría que la cantidad de ERO regresará a su estado basal.
3. La generación de un daño mecánico por perforación en un extremo de ambos cotiledones (lesión contra lateral), podría provocar un incremento diferencial en los parámetros bioquímicos, entre el lado del cotiledón de una plántula lesionada con respecto al lado del cotiledón no lesionado de la misma planta; siendo estos parámetros mayores en el lado del cotiledón herido de la plántula lesionada.
4. La lesión mecánica producida en un extremo de uno de los dos cotiledones (lesión sistémica), generará un aumento diferencial en los parámetros bioquímicos, entre el cotiledón lesionado con respecto al cotiledón sano de la misma planta.

4. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de una lesión por herida a nivel de los cotiledones de *Ipomoea purpurea* y correlacionarlo con la actividad enzimática de, catequin oxidasa (Cox), catequin peroxidasa (Cpx), guayacol peroxidasa (Gpx), las isoenzimas de cada una de ellas, la cantidad de fenoles y las especies reactivas de oxígeno (ERO) a tiempos cortos y largos de recuperación.

B. OBJETIVOS PARTICULARES

Se efectuaron dos tipos de lesión mecánica (extracción de un cilindro de 1.58 mm de diámetro). La lesión contra lateral consistió en realizar la perforación en un extremo de ambos cotiledones. En la lesión sistémica se perforó sólo un extremo de uno de los dos cotiledones. Ambas lesiones se contrastaron con los cotiledones de una plántula sana.

1. Diseño de Lesión Contra Lateral

- a. Cuantificar y ubicar la producción de ERO a tiempos cortos de recuperación (0, 20, 30 y 120 minutos) posteriores a una lesión por herida en los cotiledones.
- b. Cuantificar y localizar la actividad de catequin peroxidasa, catequin oxidasa y guayacol peroxidasa, así como de sus isoenzimas existentes a tiempos largos de recuperación (24 hr) posteriores a una lesión por herida en los cotiledones.
- c. Cuantificar y localizar el contenido de compuestos fenólicos a tiempos largos de recuperación (24hr) posteriores a una lesión por herida en los cotiledones.

2. Diseño de Lesión Sistémica

- a. Cuantificar y ubicar la producción de ERO a tiempos cortos de recuperación (0, 20, 30 y 120 minutos) posteriores a una lesión por herida en los cotiledones.
- b. Cuantificar y localizar la actividad de catequin peroxidasa, catequin oxidasa y guayacol peroxidasa, así como de sus isoenzimas existentes a tiempos largos de recuperación (24 hr) posteriores a una lesión por herida en los cotiledones.
- c. Cuantificar y localizar el contenido de compuestos fenólicos a tiempos largos de recuperación (24hr) posteriores a una lesión por herida en los cotiledones.

5. METODOLOGÍA

A. MATERIAL BIOLÓGICO Y GENERACIÓN DEL DAÑO MECÁNICO

En 1998 se colectaron semillas maduras deshidratadas de los campos de cultivo de maíz del estado de Morelos, los cuales se encontraban infestados con *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. Estas fueron usadas como banco de semillas para propagar la especie. Dichas semillas fueron germinadas y las plantas resultantes fueron crecidas en la Ciudad de México; de éstas plantas se obtuvieron semillas maduras deshidratadas, las cuales se conservaron a temperatura ambiente. De la cosecha 2004 se seleccionaron semillas con peso aproximado de 20 mg, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% durante 15 minutos, seguida de cinco lavados con agua estéril. Posteriormente las semillas fueron sembradas bajo condiciones de esterilidad en cajas Petri las cuales contenían papel filtro, dejándose en incubación a 25 °C en obscuridad. Transcurridas 48 horas después de iniciada la embibición las plántulas se lesionaron a nivel de los cotiledones, dejándose posteriormente en recuperación 0 a 120 minutos (tiempos cortos), y/o hasta 24 horas (tiempos largos) según el caso. Se llevaron a cabo dos diseños de lesión de los cotiledones, la cuál se realizó mediante la extracción de un cilindro de 1.58 mm de diámetro. El diseño de lesión contra lateral consistió en realizar la perforación en la mitad de cada uno de los cotiledones, obteniéndose así el lado del cotiledón herido de la planta lesionada (LChPI) y el lado del cotiledón sano de la planta lesionada (LCsPI), los cuales se compararon contra el lado de un cotiledón sano de una planta sana (LCsPI; Fig. 8). En el diseño de lesión sistémica únicamente se perforó un extremo de uno de los dos cotiledones, resultando de esta manera el cotiledón herido de la planta lesionada (SChPI) y el cotiledón sano de la planta lesionada (SCsPI), dichos cotiledones fueron contrastados contra un cotiledón sano de una planta sana (SCsPs; Fig. 9). En los dos tipos de lesión cada grupo contó con una n = 6.

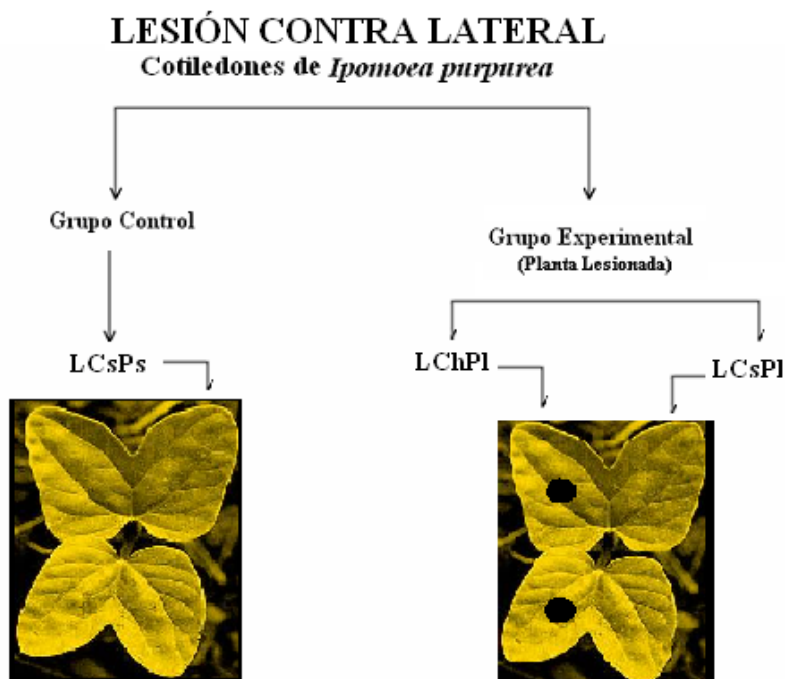


Fig. 8. Diseño experimental para la lesión contra lateral. Esta forma de lesión consistió en realizar la perforación en un extremo de ambos cotiledones, obteniéndose así dos condiciones experimentales: el lado de los cotiledones heridos de la planta lesionada (LChPI) y el lado de los cotiledones sanos de la planta lesionada (LCsPI), los cuales se compararon contra uno de los lados de los cotiledones sanos de una planta sana (LCsPs). Cada grupo contó con una n = 6.

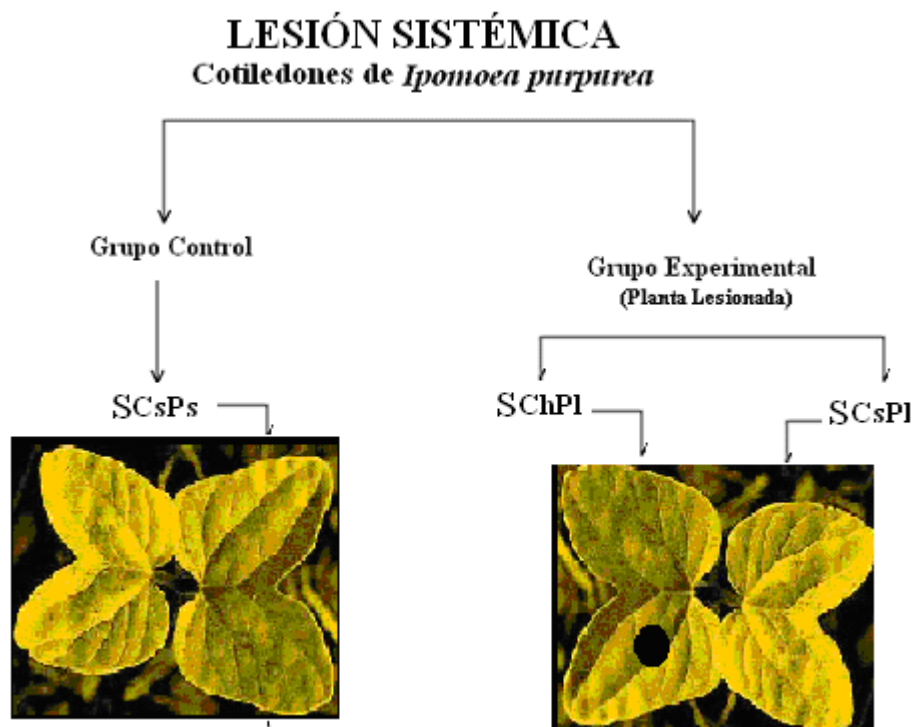


Fig. 9. Diseño experimental para la lesión sistémica. En este modelo se lesionó únicamente un extremo de uno de los dos cotiledones, resultando de esta manera el cotiledón herido de la planta lesionada (SChPI) y el cotiledón sano de la planta lesionada (SCsPI), dichos cotiledones fueron contrastados contra un cotiledón sano de una planta sana (SCsPs). Cada grupo contó con una $n = 6$.

A tiempos cortos de recuperación se cuantificó la cantidad de ión superóxido y peróxido de hidrógeno (Fig. 10). A tiempos largos de recuperación (24 horas), se determinó la actividad de las enzimas catequinoxidasa (Cox), catequinperoxidasa (Cpx), guayacolperoxidasa (Gpx) y sus isoenzimas, así como la cantidad de compuestos fenólicos (Fig. 11). Dichos parámetros bioquímicos fueron ubicados “*in situ*”. En el caso del modelo contra lateral las mediciones se realizaron en el extremo herido y en el extremo sin daño de ambos cotiledones. En el modelo sistémico las cuantificaciones se realizaron en el cotiledón herido (extremo lesionado y no lesionado) y el cotiledón sin herida de la misma planta lesionada. Ambos modelos se contrastaron con los cotiledones de una plántula sana.

B. ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Para confirmar que el daño mecánico por perforación en los cotiledones de *Ipomoea purpurea*, es capaz de generar especies reactivas de oxígeno, a tiempos cortos de recuperación, se llevaron a cabo estudios de carácter cuantitativo y cualitativo de ERO, los cuales se realizaron de acuerdo al diseño experimental que se muestra en la figura 10.

1. Cuantificación de H_2O_2 mediante Titulación Espectrofotométrica

Una vez transcurrido el tiempo de recuperación, los cotiledones de cada lote se pesaron y se homogeneizaron en 1 mL de H_2O a una temperatura de 4 °C. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 10,000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Del sobrenadante obtenido 100 μ L se

añadieron a una mezcla de reacción con H_2SO_4 1.5 M. A dicha mezcla de reacción se le adicionaron volúmenes conocidos de KMnO_4 a una concentración de $160 \mu\text{M}$, para determinar el valor de titulación, la cual se cuantificó observando el vire de color a una longitud de onda de 530 nm (Comunicación personal Corona-Carrillo., modificado del método de Johnson y Temple, 1964).

2. Cuantificación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mediante la reacción de XTT

Después de transcurrido el tiempo de recuperación de los cotiledones, éstos fueron divididos en dos grupos para realizarles la cuantificación de superóxido, mediante una modificación de la técnica de Sutherland y Learmonth (1997). En el primer grupo, las muestras se homogeneizaron en ausencia o presencia de un quelante [CuCl_2 $30 \mu\text{M}$ ó tetrakis (1-metil 4 piridil) porfina (TMP) $100 \mu\text{M}$], inmediatamente después se les adicionó una solución 0.5 mM de XTT, en amortiguador de citrato de sodio 10 mM a $\text{pH} 6.0$, con 1 mM de KCl , 0.1 mM de CaCl_2 (Frahry y Schopfer, 2001). En el segundo grupo, los cotiledones se incubaron durante 10 minutos en ausencia o presencia de CuCl_2 o TMP, seguidos de otros 10 minutos de exposición con XTT (iguales condiciones que en el primer grupo), consecutivamente las muestras fueron homogenizadas; lo anterior con el propósito de determinar si una adecuada difusión del reactivo a través de la estructura cotiledonaria, permitía una mayor precisión en la técnica y descartar que la permeabilidad del cotiledón, pudiese ser un factor determinante en la cuantificación. Las muestras tanto del primer grupo como del segundo grupo fueron centrifugadas a $10,000 \text{ xg}$. durante 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se recuperaron los sobrenadantes, los cuales fueron cuantificados espectrofotométricamente a una longitud de onda de 470 nm , posteriormente se determinó su concentración usando un coeficiente de extinción de $2.16 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3. Ubicación "in situ" de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2

Para observar el sitio de la producción del radical súperóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), los cotiledones *in vivo* se incubaron a diferentes tiempos: 5 , 30 y 120 minutos, en amortiguador de citrato de sodio a 10 mM ($\text{pH} 6.0$), el cual contenía 0.5 mM de nitroazul de tetrazolio (NBT; Frahry y Schopfer, 2001). Para el caso de H_2O_2 los cotiledones fueron incubados en un amortiguador de acetato de sodio 50 mM , $\text{pH} 4.5$, $100 \mu\text{M}$ de N,N -dimetil formamida (DMF) y 5 mg de 3 amino 9 etil carbazol (Vallejos, 1986; Díaz-Pontones y col., 2009). Las muestras teñidas, se fijaron en paraformaldehído al 4% , durante una hora. El tejido se lavó y se infiltró en sacarosa 320 mM a $4 \text{ }^\circ\text{C}$; y posteriormente los cotiledones fueron observados en un microscopio de fluorescencia, realizándose el registro fotográfico de cada una de las condiciones experimentales.

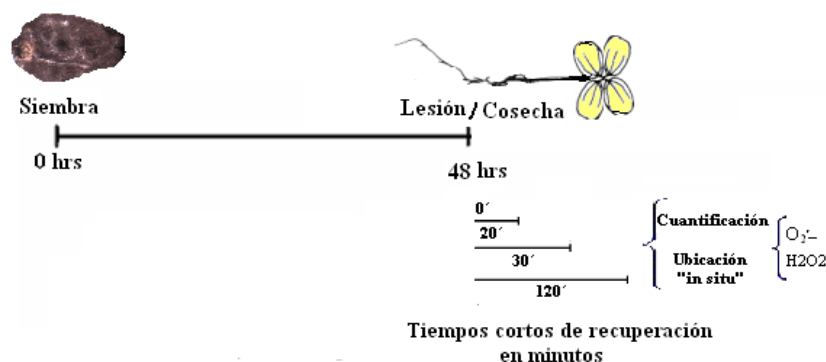


Fig. 10: Diagrama del procedimiento utilizado para el análisis de ERO, para ambos modelos de lesión.. Los cotiledones fueron lesionados 24 horas después de la embibición, dejándose en recuperación de 0 a 120 minutos (tiempos cortos), inmediatamente después se cosecharon para realizarles los métodos de cuantificación o de ubicación "in situ" según el caso.

C. ESTUDIO ENZIMÁTICO

El estudio enzimático se realizó 24 horas después de realizado el daño mecánico, para corroborar si efectivamente éste puede inducir un aumento en la actividad enzimática de catequin oxidasa, catequin peroxidasa y guayacol peroxidasa, así como presentar en forma diferencial distintas isoenzimas. Para tal efecto se siguió el diseño experimental que se muestra en la figura 11.

1. Extracción Enzimática

Para la extracción del extracto crudo enzimático los cotiledones de cada lote se pesaron y se homogeneizaron en 3 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.58, a una temperatura de 4 °C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10,000 xg. durante 30 minutos a 4 °C. En seguida se recuperó el sobrenadante y se conservó en un vial a una temperatura de 7 °C.

2. Cuantificación de Proteína Total

La determinación de la concentración de proteína total del extracto crudo enzimático se realizó utilizando el método de Lowry (Dawson y Heatlie, 1984).

3. Cuantificación Enzimática

La determinación de la actividad de catequin oxidasa (Cox), catequin peroxidasa (Cpx) y guayacol (Gpx), se llevó a cabo mediante una modificación del método de Chen y col (1992), Kubo y Kinshori (1999) y Sojo y col (1999). En el caso de la Cox se realizó una mezcla de reacción de 1 mL, la cual contenía 10 mM de catequina. Para la Cpx la mezcla de reacción de 1 mL contenía 10 mM de catequina y H₂O₂ al 3%. En el caso de Gpx la mezcla de reacción de 1 mL contenía 1 µL de guayacol en presencia de H₂O₂ al 3%. Tanto para Cox, Cpx y Gpx se utilizó un amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 6.5 y un volumen conocido del extracto enzimático. Para Cox y Cpx se monitoreó la absorbancia durante 5 minutos en intervalos de 60 segundos a 475 nm para el producto de la oxidación/peroxidación de la catequina. Para Gpx la absorbancia se monitorió durante 2 minutos en intervalos de 20 segundos a 475 nm para el producto de la peroxidación del guayacol. La actividad enzimática se expresó como unidades de actividad que equivalen al cambio en la absorbancia/minuto mg de tejido fresco, estructura y actividad específica.

4. Determinación de Isoenzimas mediante Isoelectroenfoque

Se determinaron mediante isoelectroenfoque los puntos isoeléctricos (pI), utilizando geles de poliacrilamida (6 %) de 17 cm de largo y 1 cm de diámetro, con anfolitas con un intervalo de pH de 4 a 6 y de 6 a 10, a dicha mezcla se le añadieron volúmenes conocidos del extracto crudo enzimático. Los geles se corrieron a 200 Volts durante 3 horas. En forma paralela a los geles que contenían la muestra se corrió un gel sin muestra el cual se fraccionó en secciones de 0.5 cm de largo y cada segmento se incubó en 2 mL de agua desionizada durante 24 horas, al cual posteriormente se le determinó el pH (Allen y col., 1984; Rielan, 1986).

5. Ubicación de la actividad enzimática de Cox, Cpx, y Gpx

Para visualizar los puntos isoeléctricos de las diferentes isoenzimas, se llevó a cabo la técnica de Sato y Hasegawa, 1976; Vallejos, 1986; Díaz-Pontones y col., 2008. Para las revelar las isoenzimas de Cox, los geles resultantes de la electroforesis fueron equilibrados en un amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6.8 durante 15 minutos, posteriormente el gel se incubó a 25 °C en la oscuridad, con una

solución que contenía 58 mg de catequina en 10 mL de amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6.8, hasta que aparecieron bandas de color café. Para revelar los pI de las isoenzimas de Cpx, los geles se equilibraron en un amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6.8 durante 15 minutos, consecutivamente cada gel se incubó a 25 °C en la oscuridad, con una solución que contenía 58 mg de catequina y H₂O₂ al 3%, en 10 mL de amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6.8, hasta que aparecieron bandas de color café intenso. En el caso de Gpx los geles se equilibraron en un amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5 durante 15 minutos, transcurrido este tiempo los geles se incubaron a 25°C en la oscuridad, en una mezcla de reacción que contenía 1µL de guayacol y H₂O₂ al 3%, en 10 mL de amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. Finalmente como control positivo para las peroxidasas se llevó a cabo la determinación de isoenzimas con amino etil carbazol (AEC), en donde los geles se incubaron a 25°C en la oscuridad, en una mezcla de reacción que contenía 100 µL de N,N-dimetil formamida (DMF), 5 mg de 3 amino 9 etil carbazol y 750 µL de H₂O₂ al 3%, hasta que aparecieron bandas rojas.

La ubicación “*in situ*” de la actividad de de Cox, Cpx, y Gpx en fracciones frescas de cotiledones de las tres condiciones experimentales en forma individual, se llevó a cabo siguiendo la estrategia que se muestra en la figura 10. Para tal efecto el material vegetal fue sometido a los mismos tratamientos de revelado utilizados para visualizar los puntos isoelectrónicos de cada una de las enzimas. Una vez teñidos, los cotiledones se introdujeron en paraformaldehído al 4%, durante una hora. Luego el tejido se lavó tres veces, con agua desionizada, por espacios de diez minutos. Enseguida se incluyeron en una solución de sacarosa 320 mM y se guardaron a 4 °C. Posteriormente las muestras fueron observadas a 340 nm en un microscopio de fluorescencia Axioskop (Zeiss Germany), realizándose el registro fotográfico para cada una de las condiciones experimentales.

D. CONTENIDO DE FENOLES

Para verificar que los compuestos fenólicos, 24 horas después de la lesión, pueden generarse por síntesis de *novos*, se siguió el procedimiento que se muestra en la figura 11.

1. Cuantificación de Fenoles

Los fenoles fueron extraídos según el protocolo de Reich y col. (2006). Para tal efecto se introdujeron 100 mg de cotiledones de cada una de las tres condiciones experimentales en forma independiente, en 100 mL de etanol al 80 %. La muestra se homogenizó por 10 minutos. El homogeneizado resultante se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos. A continuación se recuperó el sobrenadante (fracción acuosa/etanólica), al cual se le determinó el contenido de fenoles totales, fenoles reducidos y protoantocianidinas.

a. Fenoles Detectados con Reactivo de Folín

Se determinaron usando el método reportado por Scalbert y col., 1989. Para tal efecto en un tubo Eppendorf se colocó 0.1 mL de la fracción acuosa/etanólica, a la cual se le adicionó 0.5 mL de reactivo Folín (diluido 10 veces con agua desionizada), la muestra se agitó vigorosamente para lograr una mezcla homogénea. Inmediatamente se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. A continuación se le adicionó 0.4 mL de solución Na₂CO₃ al 7.5 % en agua desionizada y se calentó a 50 °C durante 5 minutos, transcurrido este tiempo la muestra fue enfriada. En un espectrofotómetro se determinó la absorbencia a 760 nm. Para la determinación cuantitativa se realizó una curva patrón de 0.8 a 8.0 µg de ácido gálico

b. Fenoles Reducidos

Los fenoles reducidos se determinaron llevando a cabo el método publicado por Price y Butler en 1977. Para tal efecto a 1 mL de la fracción acuosa/etanólica, se adicionaron 60 µl de solución de FeCl₃ 0.1 M en HCl 0.1 N, la mezcla se agitó vigorosamente. En seguida se adicionó 60 µl de la solución de K₃Fe(CN)₆ 0.008 M en HCl 0.1 N, se agitó nuevamente la mezcla y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Mediante el uso de un espectrofotómetro se obtuvo la absorbencia a 720 nm, la cual fue comparada con una curva con un intervalo entre 0 a 10 µg de ácido tánico.

c. Protoantocianidinas

Las Protoantocianidinas fueron determinadas mediante la técnica de Swain y Hellis, 1959; Price y col., 1978. Por tal motivo se colocó 0.5 mL de la fracción acuosa/etanólica en tubos Eppendorf de 2 mL, a la cual se le adicionó 1 mL de solución de vainillina al 1% disuelta en H₂SO₄ al 70%, la muestra se agitó vigorosamente para lograr una mezcla homogénea. Los tubos de reacción se mantuvieron en un baño a 20°C durante 15 minutos. Inmediatamente en un espectrofotómetro se determinó la absorbencia a 500 nm. En seguida se comparó con una curva patrón de 4 a 40 µg con catequiza.

2. Ubicación "in situ" de Fenoles

Fracciones frescas de cotiledones de las diferentes condiciones experimentales en forma individual, se incubaron en una solución que contenía 89 mL de agua desionizada, 0.25 mL de ácido acético glacial, 10 mL de formalina al 37% y 2g de FeSO₄; hasta que el tejido se tiñó de color azul (Johansen, 1940; Rawlins and Takahashi, 1952). Una vez teñida la muestra, fue fijada en paraformaldehído al 4%, durante una hora. Inmediatamente el tejido se lavó y se infiltró en sacarosa 320 mM a 4 °C. Los cotiledones fueron observados en un microscopio de fluorescencia, realizándose el registro fotográfico para cada una de las condiciones experimentales.

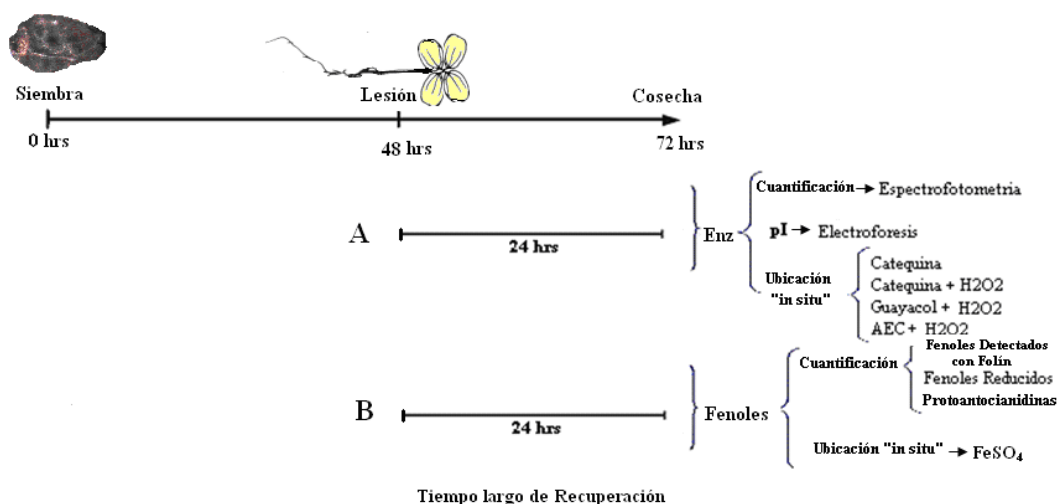


Fig. 11: Diagrama del procedimiento seguido en el estudio enzimático y en el estudio de fenoles, para ambos modelos de lesión. En los dos estudios los cotiledones fueron lesionados 48 horas después de la embibición, dejándose 24 horas de recuperación (tiempo largo). En A: se muestran las estrategias utilizadas para el estudio enzimático (Enz): cuantificación de la actividad de las enzimas, determinación de puntos isoeléctricos (pI), y localización histoquímica "in situ" usando como sustratos catequina, catequina + H₂O₂, guayacol + H₂O₂ y AEC + H₂O₂. En B: se muestran los tipos de fenoles que se determinaron mediante espectrofotometría, así como el compuesto utilizado para la ubicación "in situ" de éstos compuestos.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos experimentalmente fueron analizados mediante una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tuckey con una $P < 0.05$ utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17.

6. RESULTADOS

A. EFECTO DE LA LESIÓN EN LA CANTIDAD DE PROTEÍNA Y PESO FRESCO

1. DISEÑO CONTRA LATERAL

El presente estudio se centra en el periodo de post-germinación de la plántula de *Ipomoea purpurea*. El estudio comienza 48 horas después de iniciada la embibición, tiempo en el que se realizó una perforación en un extremo de ambos cotiledones, dejándose éstos en recuperación hasta completar las 72 horas. Durante este intervalo el peso fresco del LChPI presentó un decremento significativo con respecto al control (Fig. 12A); no obstante la cantidad de proteína fue constante para las tres condiciones experimentales (Fig. 12B); indicando que probablemente la diferencia en peso fresco se deba a la pérdida de agua a través de la herida, más que a la disminución de la masa por la perforación.

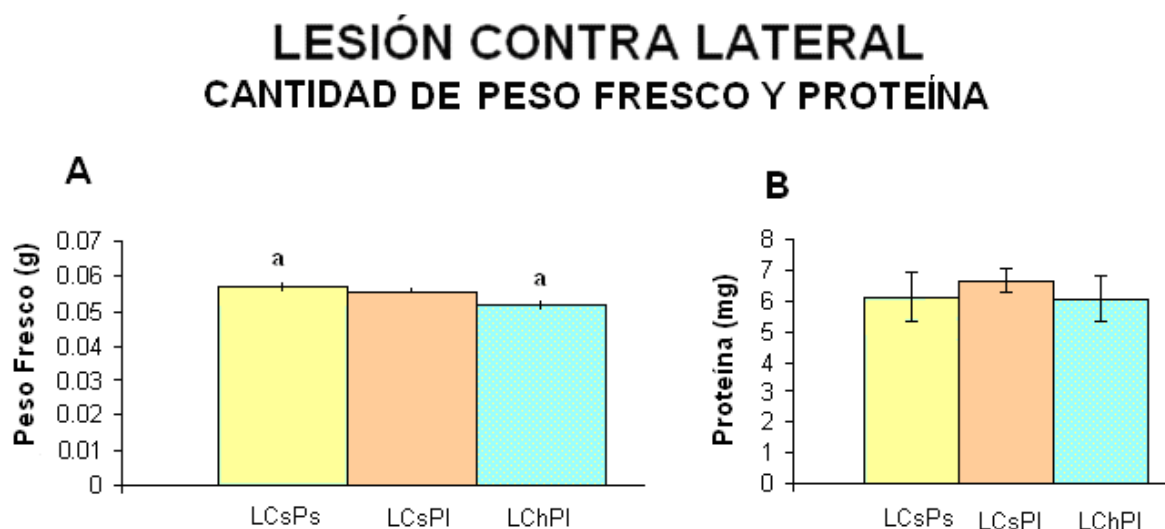


Fig. 12: Cantidad de proteína y peso fresco; Diseño Contra Lateral. A, muestra el peso fresco expresado en gramos (g); B presenta la cantidad de proteína obtenida en miligramos (mg), obtenido para cada una de las condiciones experimentales, 72 horas después de iniciada la embibición. Dichos resultados representan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), y se señala la significancia $P < 0.05$ con respecto al control (a). Abreviaturas: LCsPs = extremo del cotiledón sano de la planta sana, LCsPI = extremo del cotiledón sano de la planta lesionada y LChPI = extremo del cotiledón herido de la planta lesionada.

2. DISEÑO SISTÉMICO

De manera paralela y bajo las mismas condiciones que en el diseño contra lateral, se realizó el estudio de lesión sistémica. En este caso la herida se efectuó en un extremo de uno de los dos cotiledones, 48 horas después de iniciada la embibición, dejándose en recuperación hasta completar las 72 horas, en que se procesó cada cotiledón en forma independiente. A diferencia del diseño anterior, en el diseño sistémico el peso fresco (Fig. 13A), así como la cantidad de proteína (Fig. 13B) de los cotiledones de las tres condiciones experimentales no presentaron cambios significativos.

LESIÓN SISTÉMICA CANTIDAD DE PESO FRESCO Y PROTEÍNA

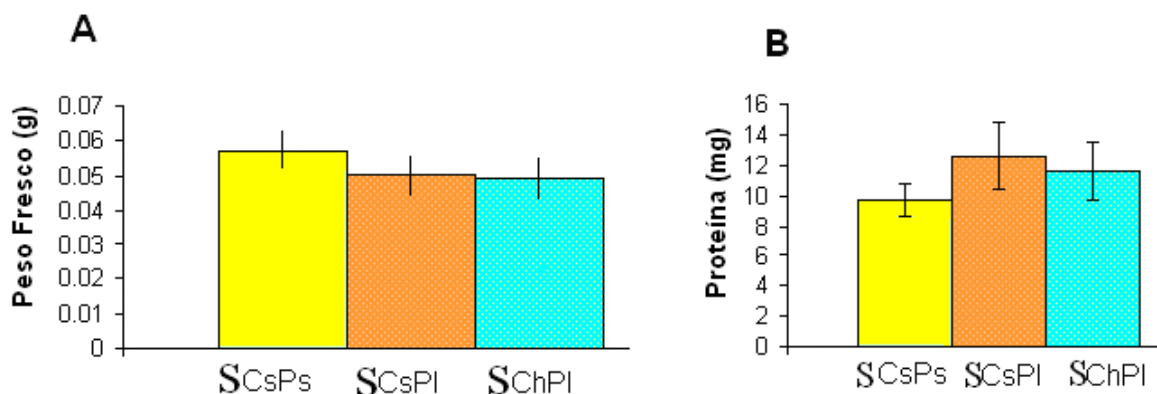


Fig. 13: Cantidad de proteína y peso fresco; Lesión Sistémica. En A, se muestra el peso fresco expresado en gramos (g), en B la cantidad de proteína obtenida en miligramos (mg), obtenido para cada una de las condiciones experimentales. Dichos resultados representan la $\bar{X} \pm \text{EEM}$ (n=4), a los cuales se les realizó una prueba estadística con $P < 0.05$, sin que ninguno resultara significativo.

B. ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

1. UBICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA ZONA DE LESIÓN

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

Para confirmar que el daño mecánico por perforación en los cotiledones de *Ipomoea purpurea*, es capaz de generar especies activas de oxígeno en el sitio de la lesión, y poder determinar su localización, se realizó la ubicación “*in situ*” de peróxido de hidrógeno mediante la tinción con amino etil carbazol (AEC), el cual reacciona con el H_2O_2 endógeno producido por el cotiledón. Esta técnica demostró mediante la observación en microscopia de fluorescencia, que la zona de mayor producción de H_2O_2 , se encuentra localizada alrededor del sitio de lesión y en las zonas contiguas a la herida en el LChPI a tiempos cortos de recuperación (Fig. 14A1 a 14C1). Asimismo en el LCsPI y en el cotiledón de la planta control, la tinción para H_2O_2 , se observaron pequeños precipitados dispersos en toda la estructura cotiledonaria, de manera similar a lo observando en el resto del LChPI. Conjuntamente a lo anterior, se reportó la formación paulatina de un precipitado color blanco fluorescente, depositado en la cercanía del borde del sitio de lesión y en el interior del parénquima adyacente al área de la herida (Fig. 15A a 15C).

b. DISEÑO SISTÉMICO

Al igual que en el diseño anterior, la técnica de tinción con amino etil carbazol (AEC), confirmó que el daño mecánico en los cotiledones de *Ipomoea purpurea*, genera peróxido de hidrógeno alrededor del sitio de la lesión y en zonas adyacentes a la herida, en el SChPI. Del mismo modo que el diseño de lesión contra lateral, en el SCsPI y el SCsPs la tinción para H_2O_2 se observó difundida a lo largo de toda la estructura cotiledonaria, pero en menor intensidad que en el área lesionada del SChPI, a tiempos cortos de recuperación (datos no mostrados).

LESIÓN CONTRA LATERAL UBICACIÓN DEL PEROXIDO DE HIDROGENO

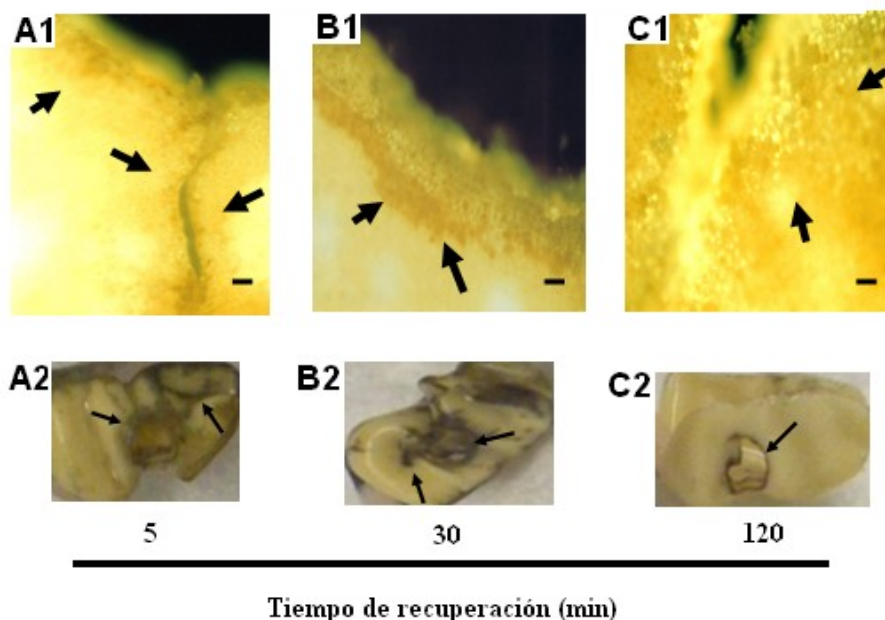


Fig. 14: Ubicación de peróxido de hidrógeno en LChPI, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. La producción de H₂O₂ fue detectada con AEC; y visualizada por microscopia de fluorescencia de onda larga (340nm) a 5min (A1), 30 min (B1) y 120 min (C1), y a nivel macroscópico (A2-C2). Las flechas señalan al H₂O₂. Las barras en A1- C1 equivalen a 1 μ m.

LESIÓN CONTRA LATERAL UBICACIÓN DEL PRECIPITADO BLANCO

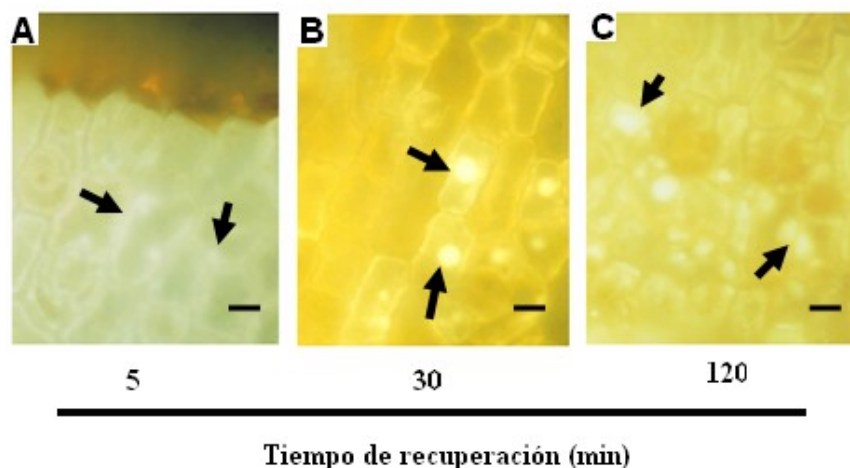


Fig. 15: Ubicación del precipitado blanco fluorescente en LChPI, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. El H₂O₂ fue detectado con AEC (tinción café). Mediante microscopia de fluorescencia de onda larga, fue posible apreciar a 5 min (A), 30 min (B) y 120 min (C), la formación paulatina de un precipitado blanco fluorescente, depositado alrededor del sitio de lesión y en las zonas contiguas a la herida. Las flechas señalan al precipitado. Las barras equivalen a 10 μ m.

2. CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

Una vez localizado el H_2O_2 , se procedió a cuantificarlo mediante la titulación con $KMnO_4$, para corroborar que la lesión, puede generar dicho intermediario de ERO, a tiempos cortos de recuperación. La determinación de la cantidad de H_2O_2 , presente en el extracto de los cotiledones de cada grupo experimental, se realizó a cero (T0), veinte (T20), treinta (T30) y ciento veinte (T120) minutos posteriores a la herida. En el caso del LCsPs en T0 de recuperación se observa una cantidad inicial de 25.50 ± 4.21 micromolas/gr de tejido fresco, la cual tiende a decrecer en un 31.11% a T20 manteniéndose ésta tendencia en los tiempos restantes de recuperación ulteriores a la herida (Fig. 16D).

Para el grupo LCsPl en T0, se reporto un valor de H_2O_2 de 21.98 ± 6.13 micromolas/gr de tejido fresco, el cual fue ligeramente menor en un 17.48%, cuando se comparo con el control, presentándose esta misma tendencia de disminución en T30 y T120 (Fig. 16E). En el caso del LChPl a tiempo cero de recuperación se obtuvo 22.51 ± 3.38 micromolas/gr de tejido fresco, las cuales al compararse con las obtenidas en el LCsPs muestran una disminución del 14.06%; en este caso se muestra una tendencia a aumentar la cantidad de H_2O_2 en T20 de recuperación, siendo este aumento de 17.29%, sin embargo en T30 se observa una ligera disminución, la cual muestra una ligera tendencia de aumento a T120 (Fig. 16F).

Entre los extremos de los cotiledones de la planta lesionada (LChPl vs LCsPl) se experimentó un aumento de H_2O_2 del 4.21%. En resumen los niveles de H_2O_2 de la planta herida tanto en el LCsPl como en el LChPl no presentaron cambios estadísticamente significativos con respecto al control. Dicho análisis de la cuantificación de H_2O_2 también se expreso por estructura (cotiledón), encontrándose que en el LCsPs, en el LCsPl y en el LChPl existe comportamiento similar al reportado en unidades por gramo de tejido fresco (Fig. 16A, 16B y 16C).

b. DISEÑO SISTÉMICO

Los datos obtenidos de la determinación cuantitativa de peróxido de hidrógeno en este tipo de lesión, utilizando la misma metodología que en el diseño contra lateral, reportaron que en el caso del SCsPs en T0 de recuperación, se observa una cantidad inicial de 20.90 ± 3.9 micromolas/gr de tejido fresco, presenta una tendencia a mantenerse de T20 a T120 minutos posteriores a la herida (Fig. 17D).

Para el grupo SCsPl en T0, se reporto un valor de H_2O_2 de 23.52 ± 7.65 micromolas/gr de tejido fresco, el cual fue ligeramente mayor en un 2.33% cuando se comparo con el control; sin embargo en este caso se observó una tendencia de aumento de H_2O_2 de aproximadamente 25% en T20, está cantidad aumento ligeramente en T30, disminuyendo posteriormente en T120 en un 42.23 %, sin presentar significancia estadística en ningún tiempo de recuperación (Fig. 17E).

En el SChPl a tiempo cero de recuperación se obtuvo 30.51 ± 3.16 micromolas/gr de tejido fresco, dicho dato en este caso, supera al reportado por la planta control en un 26.28%, aunque no es estadísticamente significativo; dicho valor tiende a disminuir en T20, no obstante en T30 se

presenta una pequeña tendencia de aumento, el cual decrece a T120 de recuperación, a ningún tiempo de recuperación se presentaron diferencias estadísticas (Fig. 17F).

Entre los cotiledones de la planta lesionada (SChPI vs SCsPI) en T0, se experimentó un aumento de H₂O₂ del 29.25%, sin ser éste un valor estadísticamente significativo. En resumen los niveles de H₂O₂ de la planta herida tanto en el SCsPI como en el SChPI no presentaron cambios estadísticamente significativos con respecto al control. En dicho análisis de la cuantificación de H₂O₂, los datos también fueron expresados por estructura (cotiledón), encontrándose para el SCsPs, el SCsPI y el SChPI un comportamiento análogo al reportado en unidades por gramo de tejido fresco (Fig. 17A, 17B y 17C).

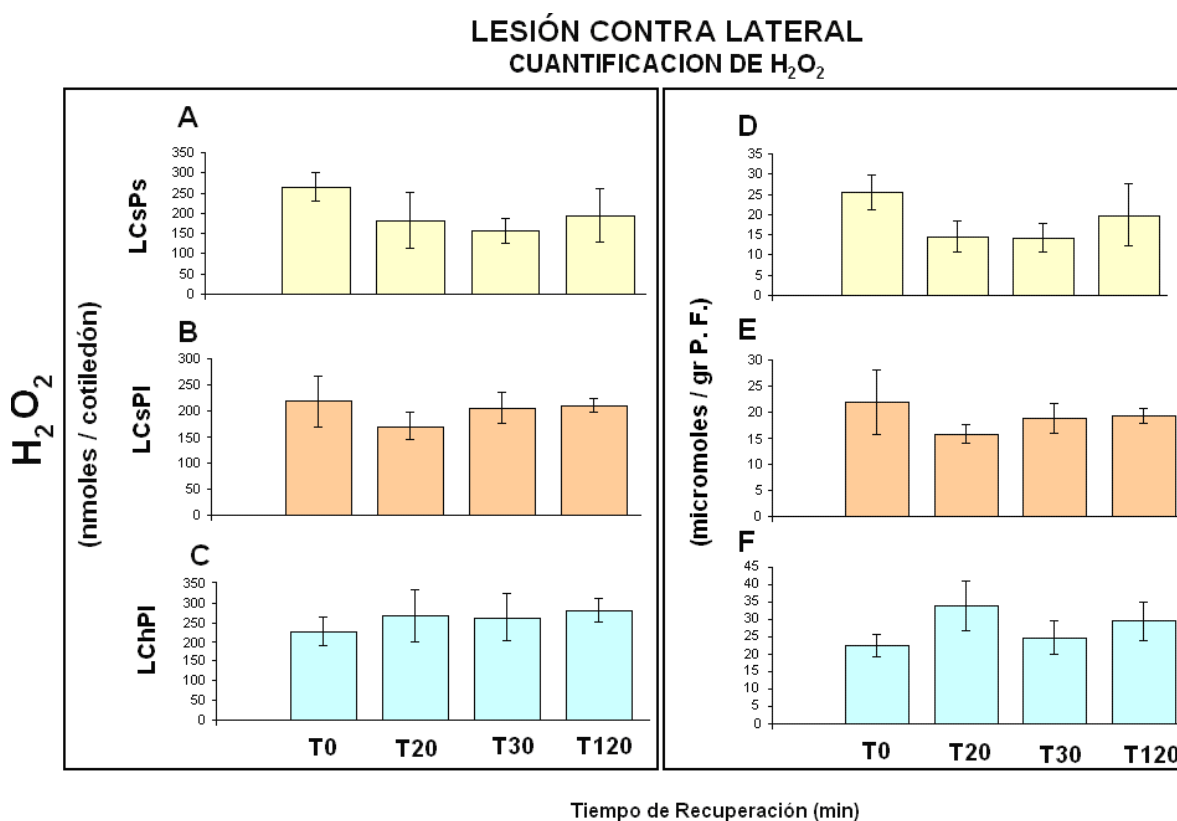


Fig. 16: Cuantificación de H₂O₂, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. Se muestra la cantidad de H₂O₂ (nmolas/cotiledón; A-C y nmolas/gr de tejido fresco; D-F), obtenida mediante la técnica de titulación con KMnO₄, para el LCsPs (A, D), el LCsPI (B, E) y el LChPI (C, F), a 0, 20, 30 y 120 minutos después de realizada la lesión. Los resultados expresan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), a los cuales se les realizó una prueba estadística con $P < 0.05$, sin que ninguno resultara significativo.

LESIÓN SISTÉMICA CUANTIFICACION DE H₂O₂

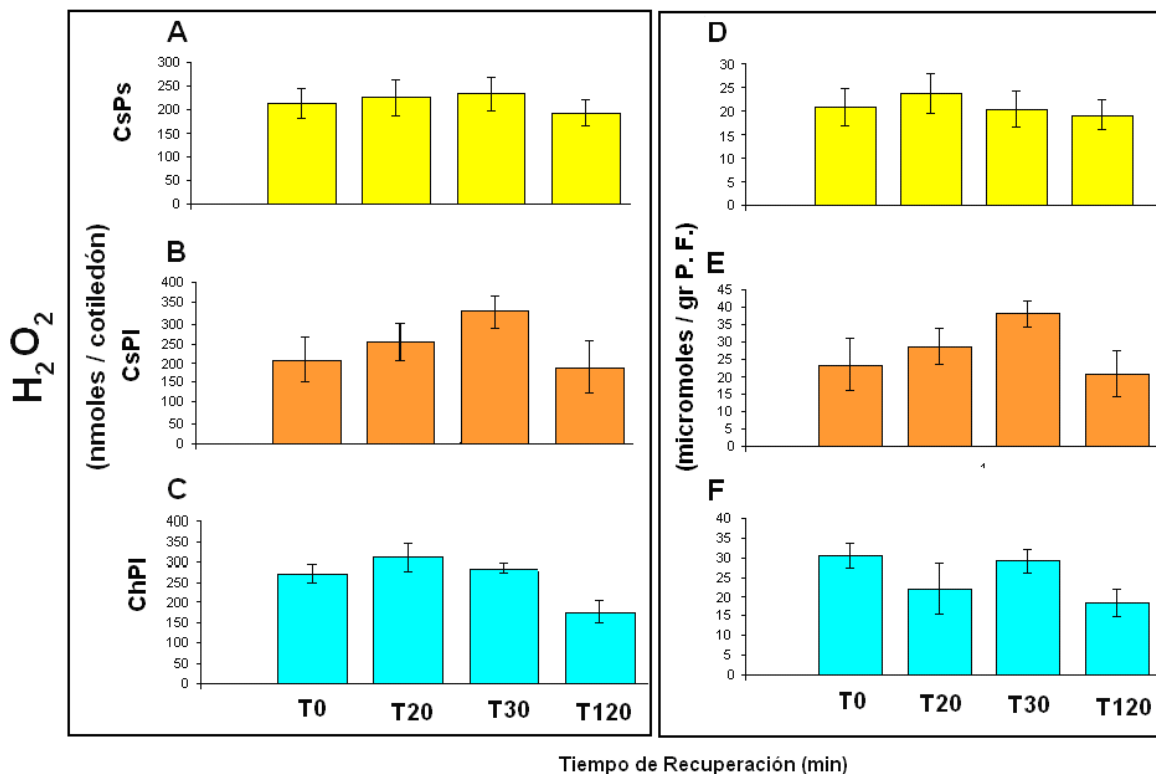


Fig. 17: Cuantificación de H₂O₂, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Sistemico. Se muestra la cantidad de H₂O₂ (nmolas/cotiledón; A-C y nmolas/gr de tejido fresco; D-F), obtenida mediante la técnica de titulación con KMnO₄, para el SCsPs (A, D), el SCsPI (B, E) y el SChPI (C, F), a 0, 20, 30 y 120 minutos después de realizada la lesión. Los resultados expresan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), a los cuales se les realizó una prueba estadística con $P < 0.05$, sin que ninguno resultara significativo.

3. UBICACIÓN DE SUPERÓXIDO EN LA ZONA DE LESIÓN

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

Además de la localización de peróxido de hidrógeno también se realizó la ubicación del radical superóxido, mediante la tinción con nitroazul de tetrazolio (NBT), en cotiledones con tiempos cortos de recuperación después de realizada la perforación. Esta técnica permitió observar que la producción de superóxido se encuentra localizada en el LChPI, en las capas del parénquima adyacentes al sitio de la LESIÓN (Fig. 18A2, 18B2 Y 18C1). Se observó que a los cinco minutos de recuperación después de producida la herida, en el extremo distal de la LESIÓN a nivel de los estomas, las células oclusivas no se tiñen con NBT, a diferencia de las células acompañantes que sí presentan una ligera coloración azul (Fig., 18A1) así como algunas células del parénquima (18B1). Asimismo en el LCsPI y en el extremo del cotiledón de la planta control, la tinción para superóxido, se observó disperso en toda la estructura cotiledonaria, a nivel del parénquima, pero con menor tinción que en el área lesionada del LChPI (datos no mostrados).

LESIÓN CONTRA LATERAL UBICACIÓN DE SUPERÓXIDO

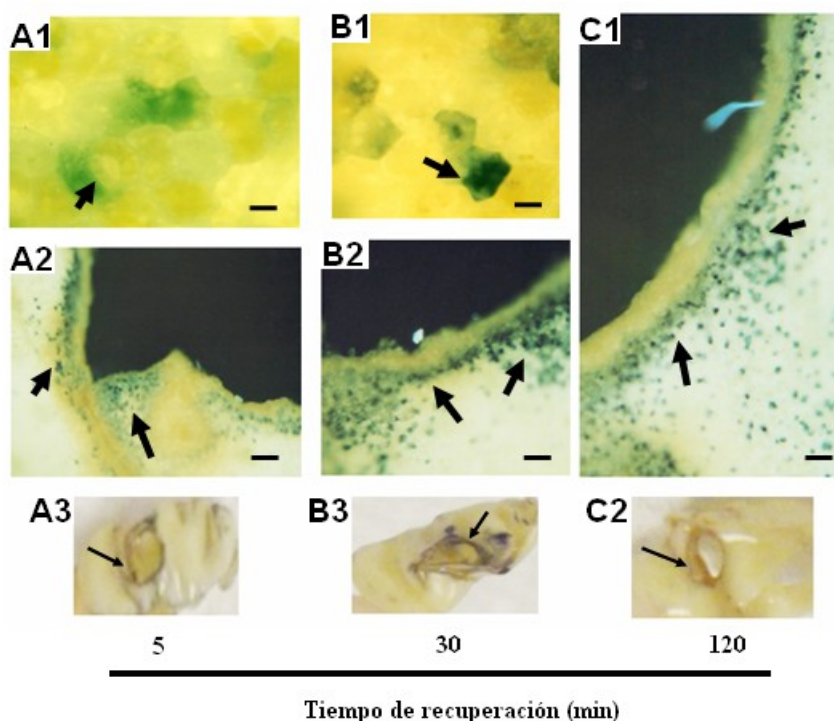


Fig. 18: Ubicación de superóxido, en LChPI, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. La producción fue detectada con NBT (tinción azul oscuro); y visualizada por microscopia de fluorescencia de onda larga (A1, A2, B1, B2, y C1), y a nivel macroscópico (A3, B3 y C2), a 5 min (A1-A3), 30 min (B1-B3) y 120 min (C1-C2) después de realizada la lesión. Las flechas señalan al superóxido. Barras en A1 y B1 equivalen a 10 μ m y en A2, B2 y C1 a 1 μ m.

b. DISEÑO SISTÉMICO

La tinción con nitroazul de tetrazolio en este tipo de herida corroboró que la producción de superóxido en el SChPI, tiene lugar alrededor del sitio de LESIÓN, y que dicha tinción se pierde paulatinamente con el transcurso del tiempo de recuperación. De igual forma que en el diseño anterior se detectó superóxido en SCsPI y SCsPs, aunque en menor magnitud en comparación con el SChPI.

4. CUANTIFICACIÓN DE SUPERÓXIDO

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

Después de realizar la ubicación del radical superóxido, se procedió a cuantificarlo utilizando la reacción del XTT. Para esta determinación las muestras del extracto de los cotiledones de cada grupo experimental, a cero (T0), veinte (T20), treinta (T30) y ciento veinte (T120) minutos posteriores a la herida, se dividieron en dos grupos. En el primero el tejido se homogenizó inmediatamente después de la herida (H.I), y en el segundo los cotiledones se homogeneizaron

después de un tiempo de incubación (H.D.T.I), en ausencia o presencia de un quelante (Ver sección del método B-2).

A continuación se describen los datos obtenidos para el grupo homogeneizado inmediatamente después de la herida. Inicialmente la cantidad de XTT reducida en los cotiledones de la planta control, reporto un promedio de 1198.73 ± 87.61 nmolas/gr de tejido fresco, cuando se utiliza en el ensayo tetrakis (1-metil 4 piridil) porfina (TMP) un quelante específico para superóxido, dicho valor disminuye significativamente en un 51.2%, cuando es comparado con los resultados del LCsPI en T0, dicho decremento tiende a mantenerse en 30 y 120 minutos posteriores a la lesión (Fig. 19A). Cuando los cotiledones de la planta control son expuestos a un tratamiento con TMP, los valores del radical sufren un decremento significativo del 19.56 %, que al confrontarse con las cifras detectadas para el LCsPI en T0, se observa una disminución estadísticamente significativa de 50%, que tiende a aumentar en T30 y T120 (Fig. 19B).

Por otro lado al compararse los resultados registrados de la cuantificación de dicho radical en el LChPI, se detectó que éstos disminuyen de forma significativa un 30.39 % con respecto a la planta control en T0, este valor disminuye aún más en los tiempos restantes de recuperación, presentándose significancia entre T120 con respecto a T0, cuando los cotiledones son tratados en ausencia de TMP (Fig. 19C). Un comportamiento similar al anterior se presentó en LChPI, cuando los cotiledones al tratados con TMP, reportaron un decremento significativo en T0 de 36.26% con respecto al control, revelándose una tendencia a mantenerse conforme transcurre el tiempo de recuperación (Fig. 19D).

Sí se comparan las cantidades de superóxido obtenidas del ensayo en ausencia de TMP, entre el extremo lesionado y la región contra lateral sin lesión de la planta herida, no se presenta significancia entre ambos extremos, sin embargo se observa una tendencia de disminución del radical en el LChPI con respecto al LCsPI (Fig. 19A vs 19C). Cuando se comparan los cotiledones del LCsPI con los cotiledones del LChPI tratados con TMP, se observa que en ambos casos la cantidad de superóxido reportada no presenta cambios significativos en sus valores de T0 a 120 minutos posteriores a la lesión (Fig. 19B vs 19D).

Finalmente la determinación de la cantidad de superóxido mediante el procedimiento HI como del procedimiento H.D.T.I, muestra que en ambos extremos de la planta lesionada (LChPI y LCsPI), tratados con y sin TMP exhiben una tendencia de disminución del radical en T0 con respecto al control para todos los casos, manteniéndose éste decremento en los tiempos restantes de recuperación (Fig. 19A-19H). No obstante en este tipo de herida, en los cotiledones H.D.T.I, se observa una mayor disminución del radical superóxido en T0, la cual es significativa en todos los casos (19E-19H). En primer lugar al comparar el LCsPs con el LCsPI en las muestras no tratadas con TMP existe una disminución del 55.93% en T0 (Fig. 19E), dicho valor se ve afectado cuando las muestras son expuestas al quelante puesto que la disminución de superóxido en el LCsPI en T0, con respecto al control fue de 47.7% (Fig. 19F).

Asimismo al comparar las muestras tratadas sin TMP del LChPI con respecto a su control en T0 disminuye en un 50.83%, tendiendo a mantenerse este comportamiento en T30 y T120 (Fig. 19G); cuando los cotiledones son tratados con el quelante en T0 se observa una disminución del 43.47% con respecto al control (Fig. 19H). En resumen tanto en los cotiledones H.I como en los H.D.T.I se muestra una clara tendencia de disminución de superóxido de T0 a T120 (Fig. 19E-H), es decir la cantidad de superóxido en la planta lesionada tanto en el LCsPI como en el LChPI, presentó una disminución significativa en relación con el LCsPs, siendo mayor la disminución en el LChPI. Los

valores de superóxido, también se expresaron en función de la estructura (cotiledón), encontrándose en cada caso un comportamiento similar al reportado en nmoles/gr de tejido fresco.

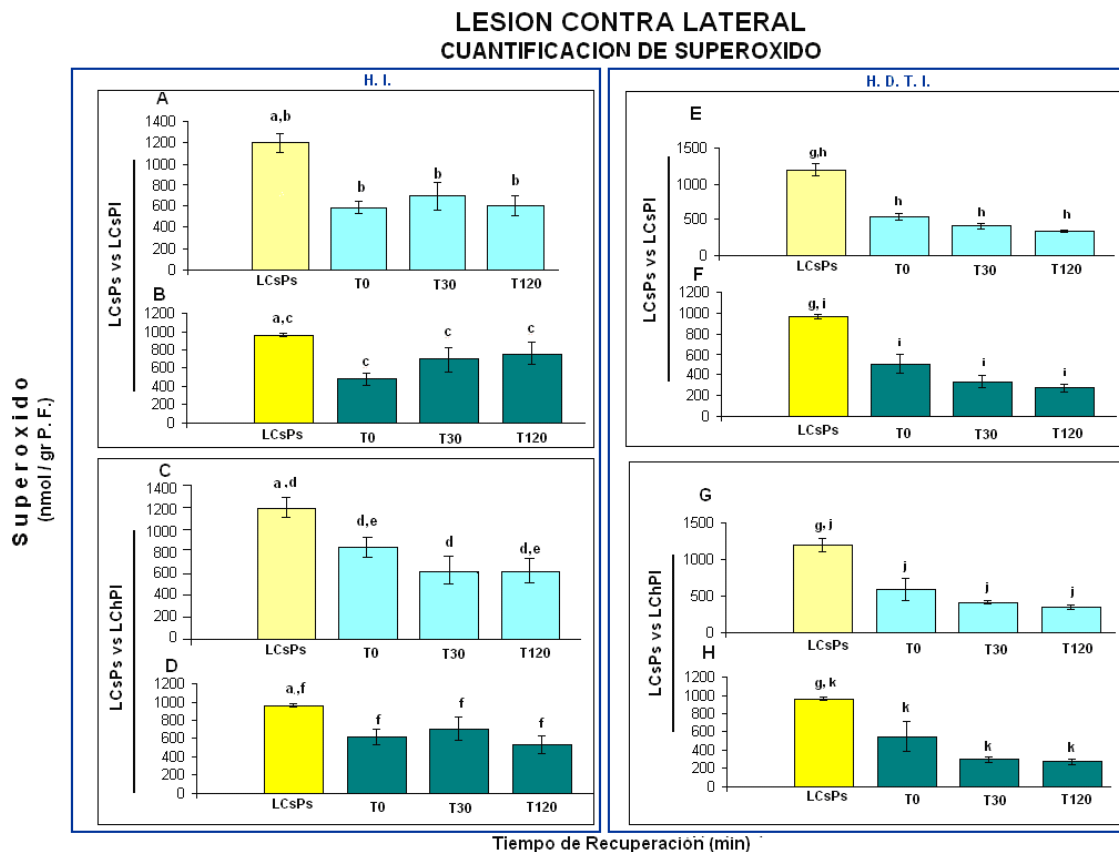


Fig. 19: Cuantificación de superóxido, Diseño Contra Lateral. Se muestra la cantidad de superóxido (nmol/gr de tejido fresco), obtenida mediante la técnica de reacción de XTT, en ausencia (A, C, E y G) y en presencia (B, D, F y H) de tetrakis (TMP), para el LCsPs vs LCsPI (A, B y E, F) y el LCsPs vs LChPI (C, D y G, H), a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida. Se presentan los graficas resultantes tanto para el grupo homogeneizado inmediatamente después de la perforación (H.I.; A - D), como para el grupo homogeneizado después de un tiempo de incubación (H.D.T.I.; E - H). Los resultados expresan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=3), y se señala la significancia $P < 0.05$ de **a-k**. Las letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.

b. DISEÑO SISTÉMICO

Para la cuantificación del radical superóxido, en este tipo de lesión, se utilizó la reacción del XTT, bajo las mismas condiciones experimentales a las que fueron sometidas las muestras del diseño anterior.

Haciendo uso de la técnica de homogeneización del tejido inmediatamente después de la herida (H.I), se obtuvo que la reacción de reducción del XTT en las muestras del SCsPs fue de inicialmente de 1104.04 ± 118.72 nmolas/gr de tejido fresco; éste valor tiende a mantenerse cuando es comparado con los resultados obtenidos en el SCsPI en T0, T30 y T120 minutos posteriores a la lesión (Fig. 20A). Cuando los cotiledones son tratados con tetrakis, la reducción del XTT de la planta control sufre un decremento significativo del 35.02 %, que al compararse con las cifras

detectadas para el SCsPI en T0, se observa un incremento significativo de 50.29% en T0, que se mantiene en T30 y disminuye ligeramente en T120 (Fig. 20B).

Por otro lado al compararse los resultados registrados de la cuantificación de superóxido mediante la reacción de reducción de XTT, se detectó que éstos presentan una tendencia de disminución con respecto a la planta control en T0, manteniéndose los niveles sin cambio desde T30 hasta T120 (Fig. 20C). En el caso del SChPI, cuando los cotiledones son expuestos a una solución con TMP, los valores de T0 hasta T120 no presentan ningún cambio significativos con respecto al control (Fig. 20D). Sí se cotejan las cantidades de superóxido obtenidas del ensayo en ausencia y presencia de TMP, entre el cotiledón lesionado y el cotiledón sano de la planta herida, no se presentan cambios significativos entre ambos cotiledones, sin embargo se observa una ligera tendencia de disminución del radical en el SChPI con respecto al SCsPI (Fig. 20A vs 20C y Fig. 20B vs 20D).

Sin embargo cuando los cotiledones fueron homogeneizados después de un tiempo de incubación (H.D.T.I), los resultados obtenidos para las muestras del SCsPI tratadas en ausencia de TMP, presentaron un comportamiento diferente al reportado en el diseño de lesión anterior; ya que los valores de superóxido en T0 fueron semejantes al control, no obstante en T120 mostraron una ligera tendencia de aumento (Fig. 20E).

Asimismo cuando las muestras del SCsPI son tratadas en presencia de TMP, la cantidad de superóxido decrece significativamente en comparación con su control, lo que implica que TMP en este caso afecta más la producción de superóxido en el periodo de incubación; no obstante en T30 se presenta una tendencia de incremento del radical, la cual se hace más evidente en T120 (Fig. 20F).

En el caso de los cotiledones heridos de la planta lesionada tratados en ausencia de TMP, en T0 mostraron una tendencia de aumentar los valores de superóxido con respecto al control, sin embargo en T30 Y T120 se presenta una ligera tendencia de disminución de la cantidad de dicho radical (Fig. 20G). Cuando los cotiledones heridos de la planta lesionada son expuestos al TMP, se observa un aumento significativo de superóxido en T0, pero en T30 se exhibe una tendencia de disminución, la cual tiende a aumentar ligeramente en T120 (Fig. 20H).

La determinación de la cantidad de superóxido en el diseño de lesión sistémica, tanto para el SCsPI como para el SChPI, haciendo uso del procedimiento HI y del procedimiento H.D.T.I, reveló que en algunos casos se muestra una tendencia de disminución (Fig. 20C), o un decremento significativo (Fig. 20F en T0) del radical superóxido; y en otros casos se presenta una tendencia o bien un aumento significativo de dicho radical (20B, 20D, 20G y 20H). Sin embargo la cantidad de superóxido en la planta lesionada tanto en el SCsPI como en el SChPI, en general presentó valores muy cercanos al control. No obstante entre SCsPI y SChPI se observó una tendencia de disminución del radical superóxido siendo ésta mayor en el SChPI.

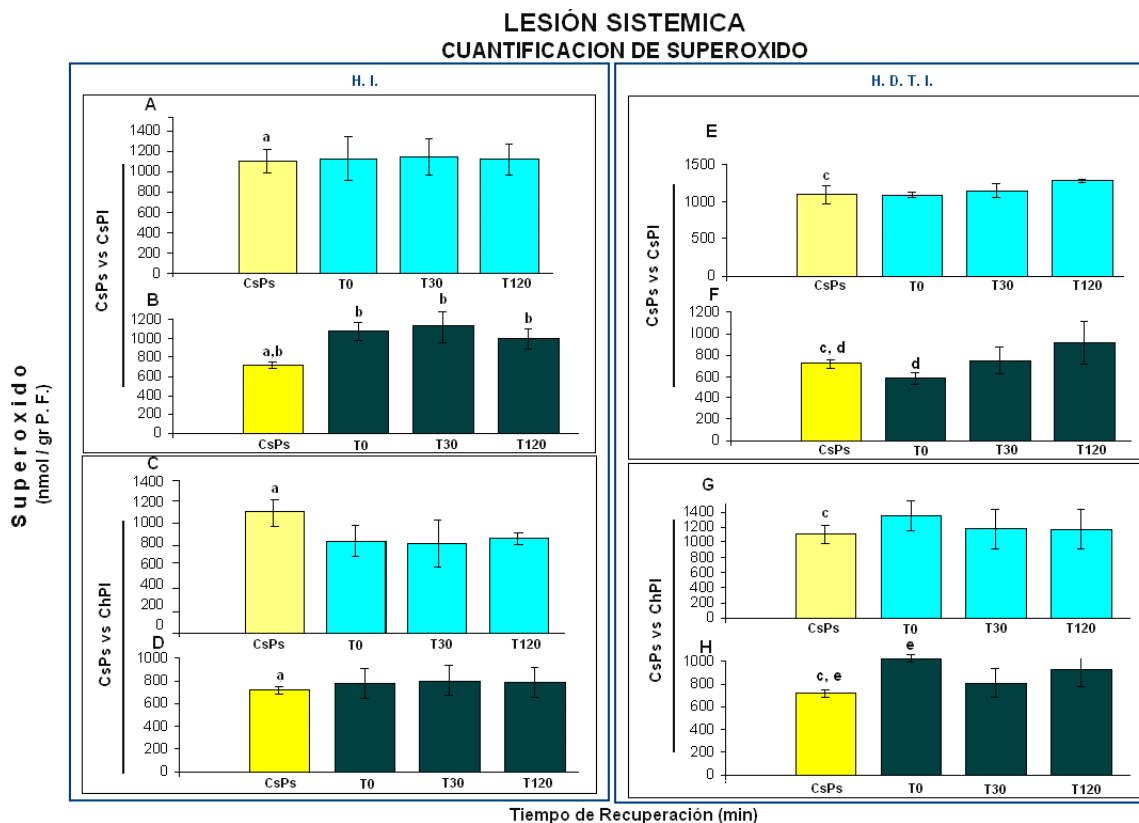


Fig. 20: Cuantificación de superóxido, Diseño Sistémico. Se muestra la cantidad de superóxido (nmol/gr de tejido fresco), obtenida mediante la técnica de reacción de XTT, en ausencia (A, C, E y G) y en presencia (B, D, F y H) de tetrakis (TMP), para el SCsPs vs SCsPI (A, B y E, F) y el SCsPs vs SChPI (C, D y G, H), a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida. Se presentan los graficas resultantes tanto para el grupo homogeneizado inmediatamente después de la perforación (H.I; A - D), como para el grupo homogeneizado después de un tiempo de incubación (H.D.T.I; E - H). Los resultados expresan la $\bar{X} \pm \text{EEM}$ (n=3), y se señala la significancia $P < 0.05$ de a-e. Las letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.

c. DISEÑO CONTRA LATERAL: EFECTO DEL CuCl_2

Además del TMP, existen una gran variedad de queladores específicos para el superóxido, entre los que se encuentra el CuCl_2 . Dicho compuesto fue ensayado para corroborar que efectivamente existe una disminución del radical, en los cotiledones de la planta lesionada a tiempos cortos de recuperación. Para tal efecto se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando CuCl_2 a una concentración de $30\mu\text{M}$, de forma similar al artículo Liskay y col., publicado en el 2004, en donde reportan que éste compuesto presenta eficiencia como atrapador del radical superóxido.

La aplicación de CuCl_2 en el LCsPI, en el tiempo cero de recuperación tanto en las muestras tratadas en ausencia como en presencia del quelante reportan valores similares de superóxido. Sin embargo a T20 y T30 posteriores a la herida, se mostró una ligera tendencia de disminución del superóxido, tanto para los cotiledones expuestos al quelante como para aquellos tratados en ausencia de CuCl_2 , tendiendo nuevamente a aumentar la concentración del radical en T120 (Fig. 21A); en este caso las muestras del LCsPI no reportaron en ningún tiempo de recuperación, cambios significativos con respecto al control.

En cuanto al LChPI, fue posible apreciar cambios significativamente diferentes entre las muestra sin tratamiento con CuCl_2 , desde T0 hasta T120 minutos posteriores a la LESIÓN. Asimismo la aplicación del quelante, reporto disminución estadísticamente significativa entre T0 y T30 de recuperación (Fig. 21B).

En síntesis los resultados obtenidos de las muestras de LCsPI y LChPI tratadas con CuCl_2 , reportaron que dicho quelante a la concentración sugerida no presenta efecto sobre el superóxido e incluso al parecer aumenta su producción (Fig. 21A y 21B). Por tal motivo esta serie de experimentos no fueron realizados en el diseño sistémico.

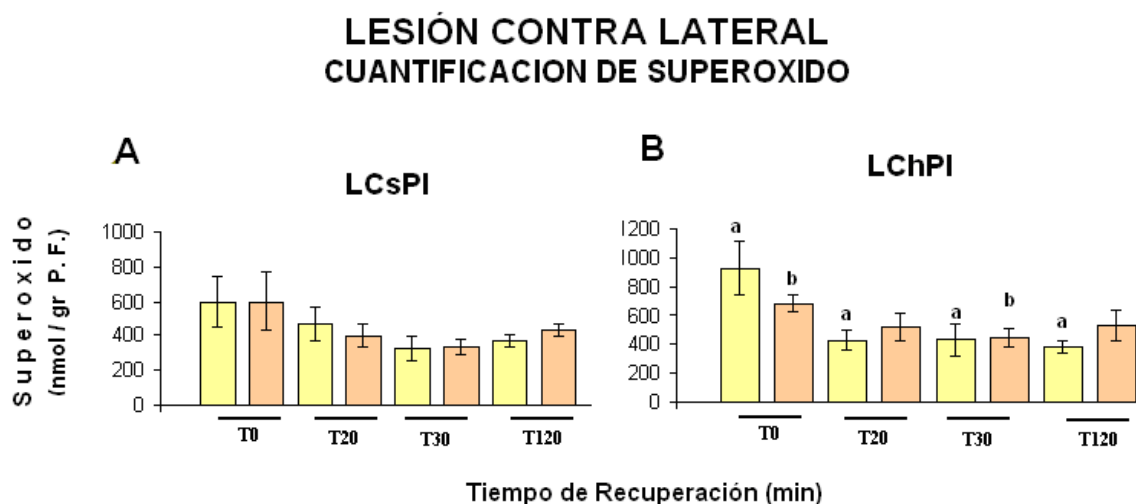


Fig. 21: Cuantificación de superóxido utilizando CuCl_2 como quelante, a tiempos cortos de recuperación posteriores a la herida; Modelo Contra Lateral. Se muestra la cantidad de superóxido (nmol/gr de tejido fresco), obtenida mediante la técnica de reducción de XTT (0.5 mM), en ausencia o presencia de CuCl_2 (30 μM), para el LCsPI (A) y el LChPI (B), a diferentes tiempos de recuperación. Los resultados expresan la $\bar{X} \pm \text{EEM}$ (n=4), y se señala la significancia $P < 0.05$ de **a-b**. Las letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.

Símbolos: ausencia y presencia de CuCl_2 .

C. ESTUDIO ENZIMÁTICO

1. UBICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

La actividad “*in situ*” utilizando como sustrato catequina, catequina + H_2O_2 , Guayacol + H_2O_2 y AEC + H_2O_2 ; veinticuatro horas después de realizada la perforación en los cotiledones de *Ipomoea purpure* en el LChPI, la tinción se presentó alrededor del sitio de LESIÓN (Fig. 22). En LCsPI y LCsPs se observó una tinción distribuida homogéneamente en toda la estructura cotiledonaria, aunque de menor intensidad a la presentada alrededor de la herida en LChPI. Indicando que existe en este órgano una cantidad de enzima (Cox, Cpx, Gpx, AECpx) constitutiva, y que el daño

mecánico es capaz de inducir, 24 horas después de la LESIÓN, la actividad de las enzimas alrededor del sitio de la LESIÓN.

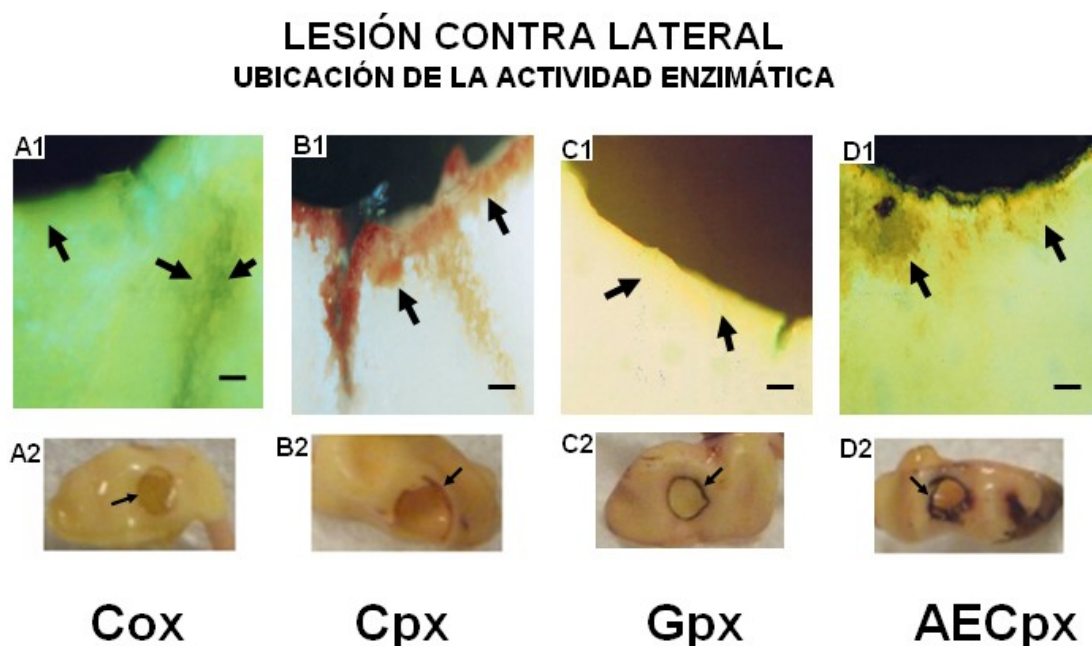


Fig. 22: Ubicación de la actividad enzimática en LChPI, 24 horas posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. La actividad fue detectada alrededor del sitio de LESIÓN y en las zonas contiguas a la herida, utilizando catequina para catequin oxidasa (Cox, A1-A2), catequina + H₂O₂ para catequin peroxidasa (Cpx, B1-B2), Guayacol + H₂O₂ para guayacol peroxidasa (Gpx, C1-C2), y AEC + H₂O₂ para peroxidasa (AECpx, D1-D2); y observada por microscopia de fluorescencia de onda larga (A1-D1), y a nivel macroscópico (A2-D2). Las flechas señalan la actividad enzimática. Las barras equivalen a 1µm.

b. DISEÑO SISTÉMICO

En este diseño la actividad “*in situ*” fue ubicada en el tejido, utilizando como sustrato catequina, catequina + H₂O₂, guayacol + H₂O₂ y AEC + H₂O₂; veinticuatro horas después de realizada la perforación en los cotiledones de *Ipomoea purpurea*. El SChPI presentó una tinción alrededor del sitio de LESIÓN (Fig. 23). También fue posible observar actividad en el parénquima tanto en los cotiledones de la planta herida como en los cotiledones de la planta control; sin embargo en el SCsPI y el SCsPs se observó una tinción de menor intensidad a la presentada alrededor de la herida en SChPI. Del mismo modo se detectó, que las células laticíferas no presentan ninguna actividad enzimática (Fig. 23A1, 23B1 y 23D1).

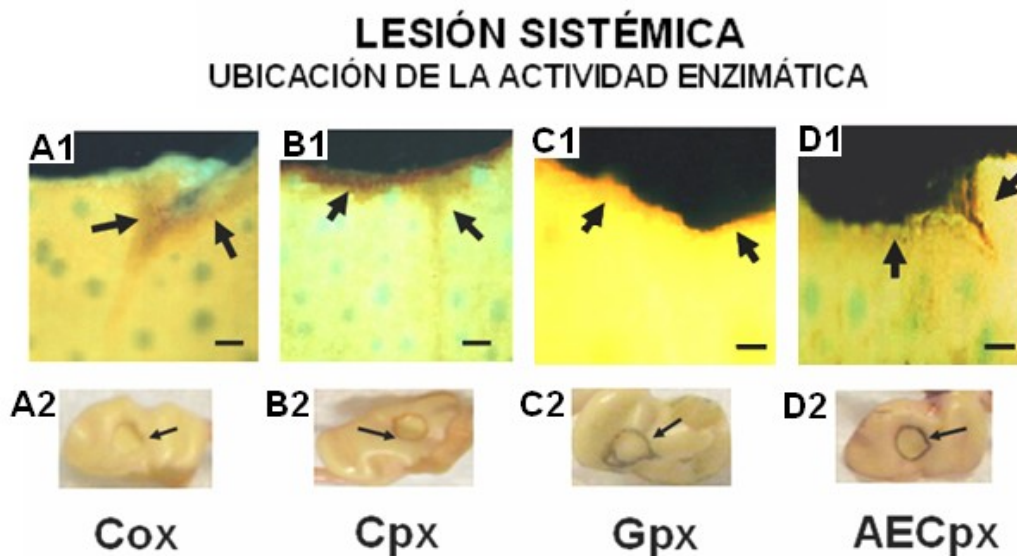


Fig. 23: Actividad enzimática en SchPI, 24 horas posteriores a la herida; Lesión Sistémica. La actividad fue detectada alrededor del sitio de LESIÓN y en las zonas contiguas a la herida, utilizando catequina para detectar catequin oxidasa (A1-A2), catequina + H₂O₂ para catequin peroxidasa (B1-B2), Guayacol + H₂O₂ para guayacol peroxidasa (C1-C2), y AEC + H₂O₂ para peroxidasas (D1-D2); y observada por microscopia de fluorescencia de onda larga (A1-D1), y a nivel macroscópico (A2-D2). En A1, B1 y D2 se observa la ausencia de actividad enzimática a nivel de las células laticíferas (células azules). Las negras en A1-D1 y en A2-AD2 señalan la actividad de las enzimas. Las barras en A1- D1 equivalen a 1µm.

2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

La actividad enzimática determinada en los cotiledones a los que se les realizó una LESIÓN en un extremo del cotiledón, se encuentra expresada en función de la estructura (Fig. 24A), del peso fresco (Fig. 24B), y la actividad específica (Fig. 24C); debido a la existencia de un cambio significativo en el peso (Fig. 24A), los datos que se describen a continuación son los obtenidos en función de peso fresco.

La actividad de la catequin oxidasa aumenta en los cotiledones de la planta lesionada, con respecto a los cotiledones de la planta control (Fig. 24B), en donde existe un cambio significativo entre el cotiledón sano de la planta lesionada (LCsPI) con respecto a el cotiledón sano de la planta sana (LCsPs); en donde la proporción entre ambas es de 25 veces siendo más alta la actividad en el LCsPI; mientras que es de 20 veces la diferencia entre el cotiledón herido de la planta lesionada (LChPI) con respecto al LCsPs, sin embargo el aumento en la actividad entre el extremo lesionado y el no lesionado o región contra lateral de los cotiledones de la planta herida, no presenta ninguna significancia (Fig. 25B). El patrón encontrado al expresar los datos por peso fresco, es similar al obtenido cuando la actividad se expresa en función de la proteína (actividad específica; Fig. 24C); a diferencia cuando se muestra la actividad en función del cotiledón únicamente la diferencia significativa se reporta entre LCsPI y el LCsPs (Fig. 24A)

La actividad de catequin peroxidasa aumenta en ambos extremos de los cotiledones de la planta lesionada en relación con los cotiledones de la planta control, éste aumento es significativo para ambos casos; sin que las diferencias entre ambos extremos de los cotiledones de la planta lesionada

presenten significancia, si la actividad es expresada en función del peso fresco (24B); no obstante al expresarse en función de estructura o actividad específica se encontró que son estadísticamente significativas las actividades entre los extremos del cotiledón lesionado (LCsPI vs LChPI), siendo mayor la actividad en el extremo no dañado del cotiledón (Fig. 24A y 24C). La proporción entre las actividades es de 3 veces en el LCsPI y de 2 veces en el LChPI con respecto al LCsPs (Fig. 25E y 25F).

La actividad de guayacol peroxidasa presentó un ligero aumento en el LCsPI con respecto a LCsPs, mientras que en el LChPI la actividad fue muy semejante a la obtenida en la planta control, sin embargo por la dispersión de los datos no permitió que éstos datos fueran estadísticamente diferentes para alguno de los tres parámetros determinados (Fig. 24A, 24B y 24C). La proporción en la actividad de esta enzima es de 1.5 veces en el LCsPI y de 1 vez en el LChPI con respecto al LCsPs (Fig. 25H y 25I)

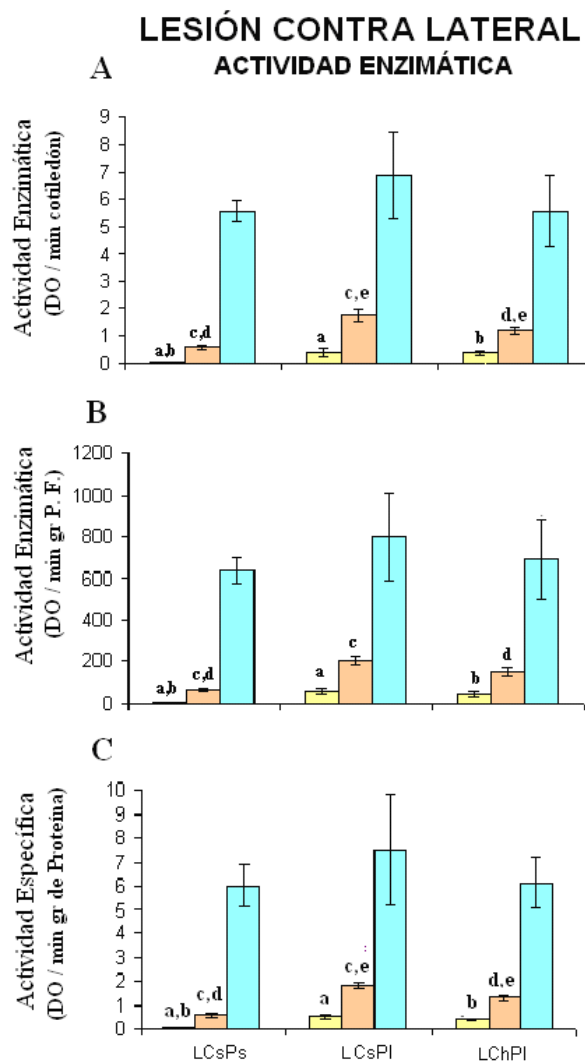


Fig. 24: Actividad Enzimática en el Diseño Contra Lateral. Se muestra la actividad enzimática obtenida 24 horas después de realizada la perforación en los cotiledones. En A los datos se expresaron en función de estructura (cotiledón), En B en función de peso fresco y en C por actividad específica. Los resultados representan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), y se señala la significancia $P < 0.05$ de a-e. Las letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales

Símbolos: Cox. Cpx. Gpx.

LESIÓN CONTRA LATERAL PROPORCIÓN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

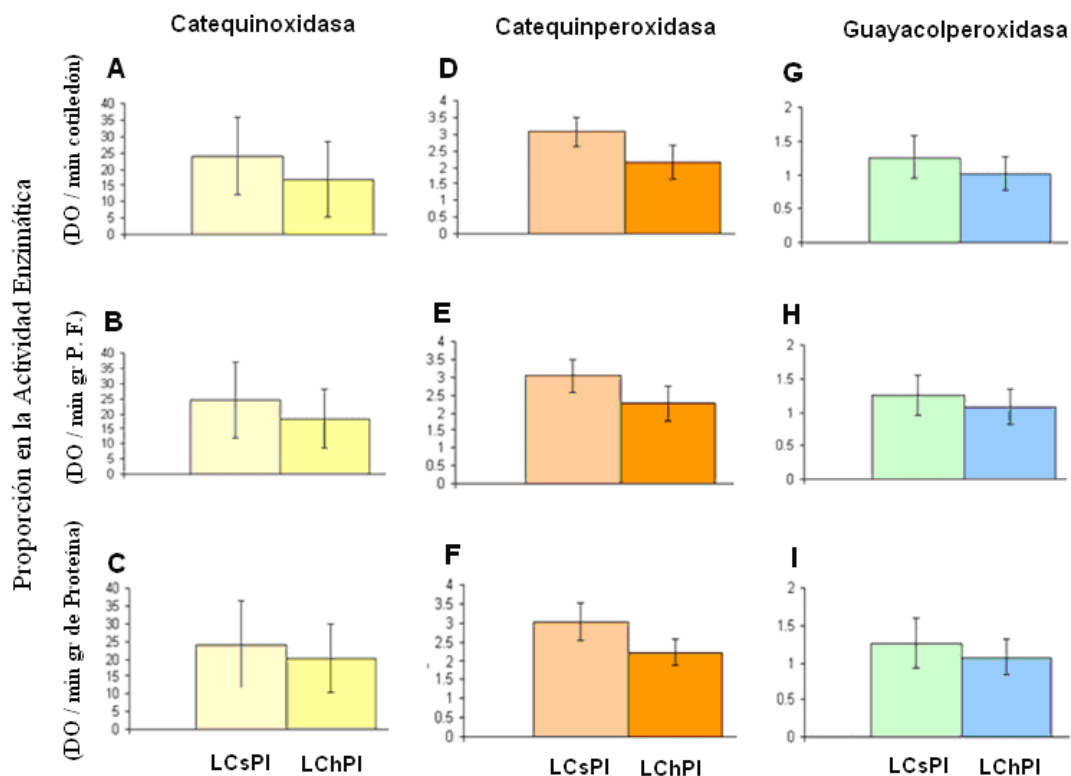


Fig. 25: Proporción en la Actividad Enzimática de Cox, Cpx y Gpx, 24 horas después de realizada la herida; Diseño Contra Lateral. Las proporción en la actividad representan en cada caso el producto del cociente de LCsPI y LChPI con respecto a su control (LCsPs); y fueron expresadas bajo tres parámetros: A, D y G, estructura (**cotiledón**); B, E y H, peso fresco (**P. F.**) y C, F e I, actividad específica (**proteína**). Los resultados muestran la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), a los cuales se les realizó una prueba estadística con $P < 0.05$, sin que ninguno resultara significativo.

b. DISEÑO SISTÉMICO

La determinación cuantitativa de la actividad enzimática de catequinoxidasa, catequinperoxidasa y guayacolperoxidasa en el presente diseño se llevó a cabo de la misma manera que en el diseño anterior, y se encuentra expresada en función de la estructura (Fig. 26A), del peso fresco (Fig. 26B), y la actividad específica (Fig. 26C). Aunque no se presentaron diferencias significativas entre el peso de los cotiledones (Fig. 13A), los datos que se describen a continuación con fines comparativos son los obtenidos en función de peso fresco.

En el caso de la actividad de la catequinoxidasa, se observa un aumento significativo en los cotiledones de la planta lesionada, con respecto a los cotiledones de la planta control (Fig. 26B), además dicha enzima mostró ser 6 veces más activa en el SChPI con respecto al SCsPs (Fig. 27B). Del mismo modo, también se observa un incremento significativo entre el cotiledón sano de la planta lesionada y el cotiledón sano de la planta sana; así la catequinoxidasa en el SCsPI, es 2 veces más activa con respecto al SCsPs (Fig. 27B). En este diseño entre los cotiledones de la planta herida se presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí, siendo mayor la actividad en el SChPI

(Fig. 26B). El patrón obtenido al expresar los datos como actividad específica (Fig. 26C), es similar al obtenido por peso fresco; a diferencia de cuando se muestra la actividad en función de estructura (cotiledón), en donde se pierde toda significancia entre los grupos (Fig. 26A).

Por otro lado la actividad de catequinperoxidasa aumenta en los cotiledones de la planta lesionada en relación con los cotiledones de la planta control, éste aumento es significativo; sin que las diferencias entre ambos cotiledones de la planta lesionada presenten significancia, sí se expresan en función del peso fresco o actividad específica (Fig. 26B y 26C), cuando se expresa la actividad enzimática por estructura se pierde toda significancia entre grupos (Fig. 26A). Para este caso la proporción en la actividad enzimática es 3 veces mayor en el SChPI y 2 veces mayor en el SCsPI con respecto al CsPs (Fig. 27E y 27F). La actividad de guayacolperoxidasa en el presente diseño, presentó un ligero aumento en el CsPI, mientras que en el SChPI la actividad se encontró una tendencia de aumento más visible, sí los datos se expresan en función de peso fresco o por estructura sin ser estadísticamente significativos; no obstante cuando éstos datos se expresan por actividad específica se reportan cambios estadísticamente significativos entre el SCsPs y el SChPI siendo éste último el que presenta mayor actividad enzimática (Fig. 26C). La proporción en la actividad enzimática en este caso fue en promedio 1.7 veces mayor en el SChPI y de 1.5 veces en el SCsPI con respecto al SCsPs (Fig. 27H)

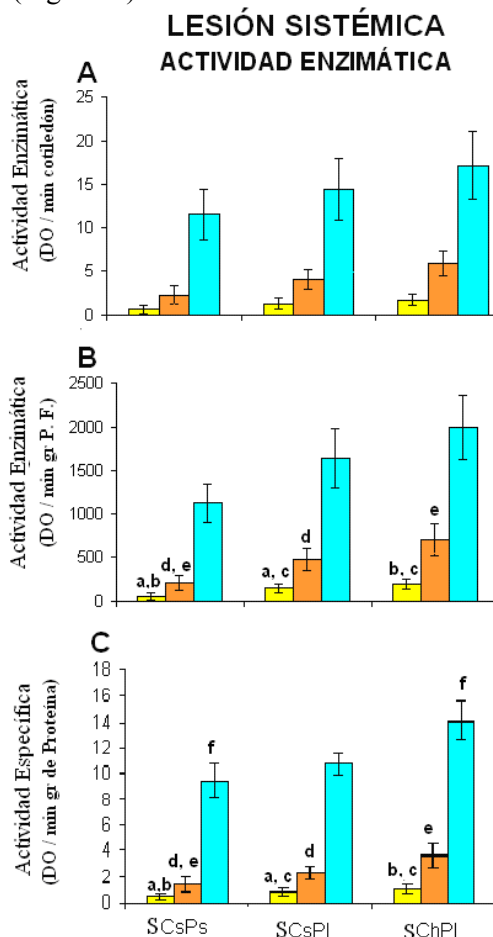


Fig. 26: Actividad Enzimática en el Diseño Sistémico. Se muestra la actividad enzimática obtenida 24 horas después de realizada la perforación en los cotiledones. En A los datos se expresaron en función de estructura (cotiledón), En B por peso fresco y en C por actividad específica. Los resultados representan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), y se señala la significancia $P < 0.05$ de a-f. Las letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales

Símbolos: Cox. Cpx. Gpx.

LESIÓN SISTÉMICA PROPORCION EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

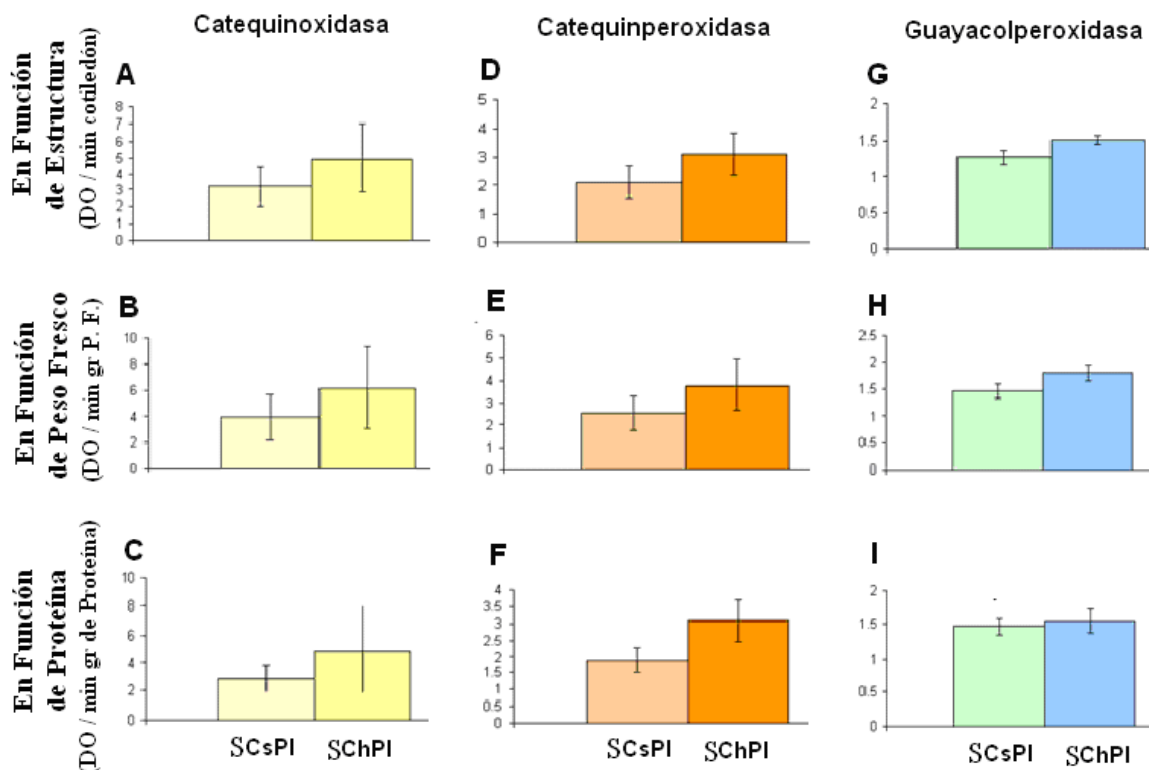


Fig. 27: Proporción en la Actividad Enzimática de Cox, Cpx y Gpx, 24 horas después de realizada la herida; Diseño de Lesión Sistémica. La proporción en la actividad representan en cada caso el producto del cociente de SCsPI y SChPI con respecto a su control; y fueron expresadas bajo tres parámetros: A, D y G, estructura (cotiledón); B, E y H peso fresco (P. F.) y C, F e I, actividad específica (proteína). Los resultados muestran la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), a los cuales se les realizó una prueba estadística con $P < 0.05$, sin que ninguno resultara significativo.

3. DETERMINACIÓN DE ISOENZIMAS MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

Una vez ubicada y cuantificada la actividad enzimática de Cox, Cpx y GPS, se determinó si 24 horas después de realizada la herida, el daño mecánico era capaz de inducir distintas isoformas de las enzimas de interés. Para tal efecto se obtuvieron los puntos isoeléctricos (pI) para el diseño contra lateral (Fig. 28; Tabla 3). Se reportaron 8 isoenzimas: tres alcalino-neutras (7.0-7.1, 7.2 y 7.3) y cinco con pI ácidos (4.5, 5.1, 5.2, 5.6 y 6.2-6.6), estando presentes en LCsPs, LCsPI y LChPI (Fig. 22A-B). Se evidenció que el pI 5.1 se encuentra presente un componente que exhibe actividad tanto de oxidasa (Cox) como de peroxidasa con los diferentes sustratos (Cpx, Gpx y AECpx) en LCsPs, LCsPI y LChPI. Se obtuvo un pI de 6.2-6.6 el cual se presentó actividad exclusivamente de oxidasa, tanto en la planta control como en la planta lesionada. Asimismo se observó que en LCsPs, LCsPI y LChPI los pI 5.2, 7.0-7.1 y 7.2 se reportan únicamente para las peroxidasas. Además fue

posible apreciar que el daño mecánico induce una isoenzima con pI 7.3, única y exclusivamente en el LChPI, la cual presentó actividad de peroxidasa (Fig. 22B). La isoenzima con pI 5.6 fue común en Gpx, AECpx y Cox, no obstante la enzima con pI 4,5 únicamente lo fue para Gpx y AEC, en los LCsPs, LCsPI y LChPI (Tabla 3).

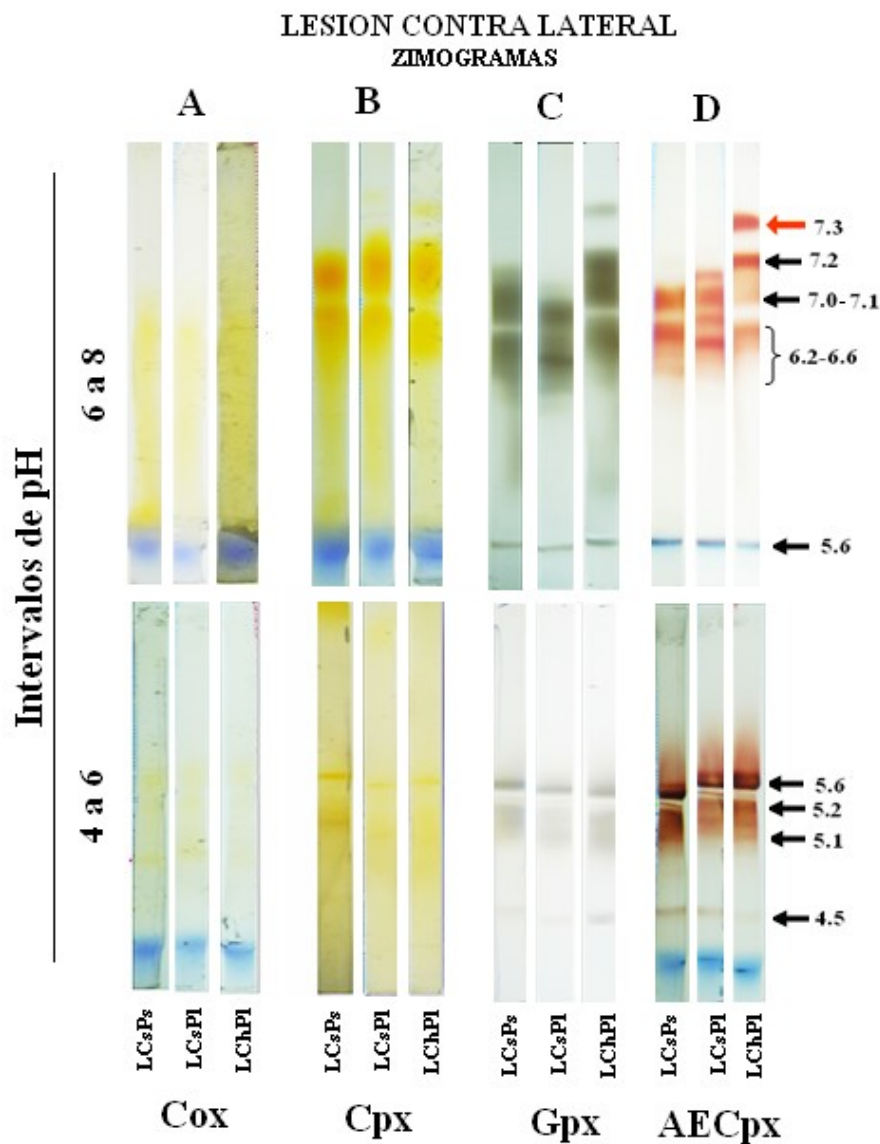


Fig. 28. Zimograma para el Diseño Contra Lateral. En el isoelectroforesis se muestran todas las isoformas para catequin oxidasa (Cox; A), catequin peroxidasa (Cpx; B), guayacol peroxidasa (Gpx; C) y amino etil carbazol (AEC; D), 24 horas después de realizada la herida. Para su obtención, se utilizaron anfolitas con un intervalo de pH de 4 a 6 y de 6 a 8, las que se mezclaron con el extracto a probar, y el gel de poliacrilamida al 6%. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la sección de métodos. Las flechas negras muestran los pI de las enzimas constitutivas del cotiledón. La flecha roja señala la isoenzima inducida por el daño mecánico en el LChPI.

Tabla 3. Isoenzimas en la lesión Contra Lateral

	Cox	Cpx	Gpx	AECpx
Constante oxidasa y peroxidasa	5.1 (LCsPs, LCsPI y LChPI)	5.1 (LCsPs, LCsPI y LChPI)	5.1 (LCsPs, LCsPI y LChPI)	5.1 (LCsPs, LCsPI y LChPI)
Exclusivo oxidasa	6.2- 6.6 (LCsPs, LCsPI y LChPI)			
Exclusivo peroxidasas		5.2 ,7.0-7.1, 7.2 (LCsPs, LCsPI y LChPI) 7.3 (LChPI)	5.2 ,7.0-7.1, 7.2 (LCsPs, LCsPI y LChPI) 7.3 (LChPI)	5.2 ,7.0-7.1, 7.2 (LCsPs, LCsPI y LChPI) 7.3 (LChPI)
Común Cox, AEC, Gpx	5.6 (LCsPs, LCsPI y LChPI)		5.6 (LCsPs, LCsPI y LChPI)	5.6 (LCsPs, LCsPI y LChPI)
Común AEC, Gpx			4.5 (LCsPs, LCsPI y LChPI)	4.5 (LCsPs, LCsPI y LChPI)

* Se muestra el consenso de los pI obtenidos para Cox, Cpx, Gpx y AECpx, en el LCsPs, LCsPI y el LChPI. En rojo se encuentra señalado el pI inducido por daño mecánico.

b. DISEÑO SISTÉMICO

Al igual que en el diseño anterior la lesión sistémica reportó 8 isoenzimas, dos alcalino-neutras: 7.5 y 7.6-7.7 y seis con pI ácidos: 4.3-4.4; 4.8; 5.1; 5.3; 6.5 y 6.73 (Fig. 31; Tabla 4). Se evidenció que las isoenzimas con pI 6.5 y 7.5, se encuentran presentes tanto en Cox como en todas las peroxidasas; sin embargo para la primera isoenzima mencionada la actividad de Cox y Cpx se localiza únicamente en SCsPs y SCsPI, mientras que en los casos restantes se presentan en SCsPs, SCsPI y el SChPI.

Por su parte todas las peroxidasas reportaron enzimas con pI de 4.3-4.4, 5.1, 5.3 y 7.6-7.7, para SCsPs, SCsPI y el SChPI, a excepción del pI 5.1 de Cpx que se obtuvo solamente en SCsPs. Los zimogramas obtenidos para Cox y AECpx, reportaron una isoenzima conspicua con pI 4.8, la cual se induce por daño mecánico y solamente se encontró en el SChPI. Finalmente la isoenzima con pI en 6.73 es exclusiva de Gpx tanto en las cotiledones de la planta control como en los cotiledones de la planta lesionada (Tabla 4).

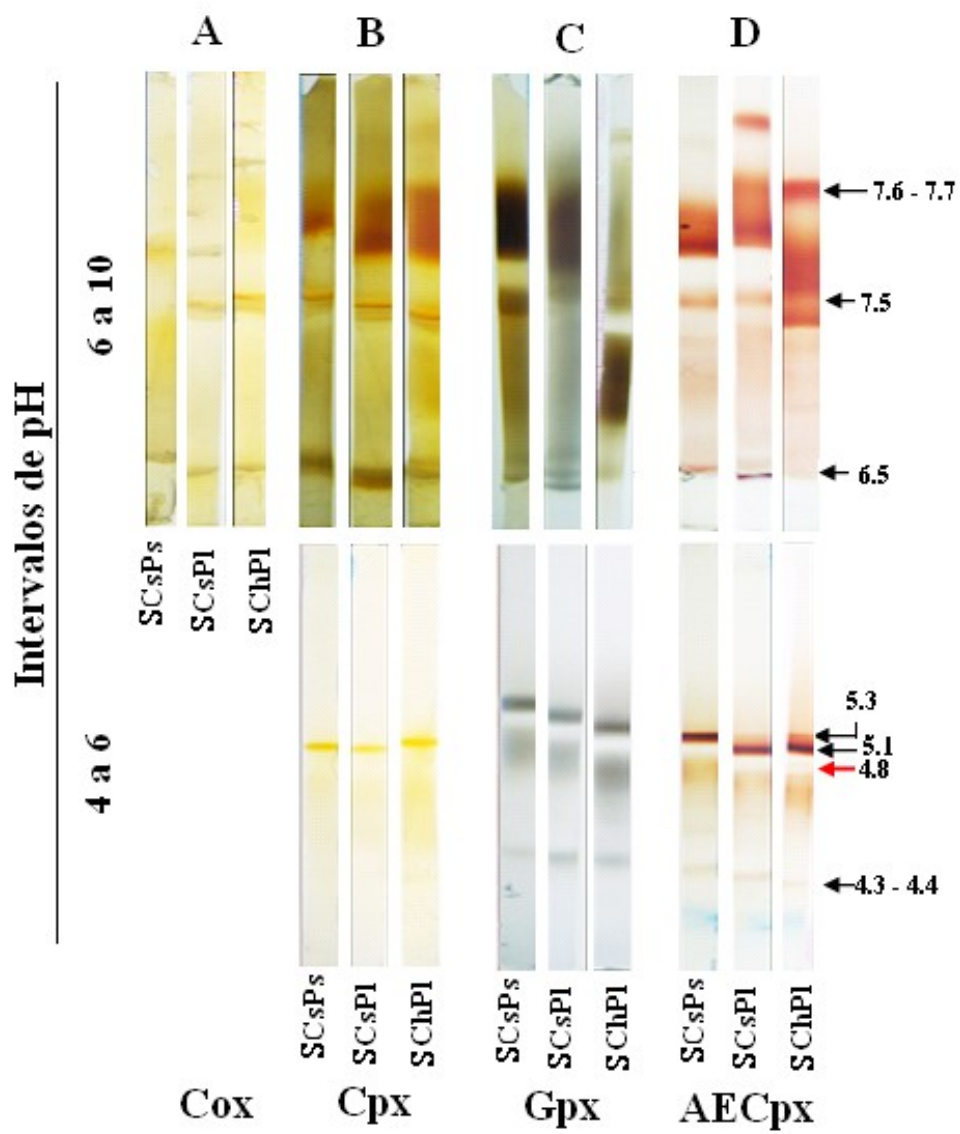


Fig. 29. Zimograma para el Diseño Sistémico. En el isoelectrofoque se muestran todas las isoformas para la catequin oxidasa (Cox; A), catequin peroxidasa (Cpx; B), guayacol peroxidasa (Gpx; C) y amino etil carbazol (AEC; D), 24 horas después de realizada la herida. Para su obtención, se utilizaron anfolitas con un intervalo de pH de 4 a 6 y de 6 a 10, las que se mezclaron con el extracto a probar, y el gel de poliacrilamida al 6%. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la sección de métodos. Las flechas negras muestran los pI de las enzimas constitutivas del cotiledón. La flecha roja señala el pI 4.8 inducido por daño mecánico en el SChPI.

Tabla 4. Isoenzimas en la Lesión Sistémica

	Cox	Cpx	Gpx	AECpx
Constante oxidasa y peroxidasa	6.5 (SCsPs, SCsPI) 7.5 (SCsPs, SCsPI, SChPI)	6.5 (SCsPs, SCsPI) 7.5 (SCsPs, SCsPI, SChPI)	6.5 (SCsPs, SCsPI, SChPI) 7.5 (SCsPs, SCsPI, SChPI)	6.5 (SCsPs, SCsPI, SChPI) 7.5 (SCsPs, SCsPI, SChPI)
Exclusivo peroxidasa		4.3 - 4.4 (SCsPs, SCsPI, SChPI) 5.1 (SCsPs) 5.3 (SCsPs, SCsPI, SChPI) 7.6 - 7.7 (SCsPs, SCsPI, SChPI)	4.3 - 4.4, 5.1, 5.3, 7.6 - 7.7 (SCsPs, SCsPI, SChPI)	4.3 - 4.4, 5.1, 5.3, 7.6 - 7.7 (SCsPs, SCsPI, SChPI)
Común Cox, AEC	4.8 (SChPI)			4.8 (SChPI)
Únicamente Gpx			6.73 (SCsPs, SCsPI, SChPI)	

* Se muestra el consenso de los pI obtenidos para Cox, Cpx, Gpx y AECpx, en el SCsPs, SCsPI y el SChPI. En rojo se encuentra señalado el pI inducido por daño mecánico.

D. CONTENIDO DE FENOLES

1. UBICACIÓN DE FENOLES

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

Para corroborar que 24 horas después de realizada la perforación en los cotiledones de *Ipomoea purpurea*, puede generarse por síntesis de *novo* de fenoles en el sitio de la herida, se llevó a cabo la tinción con FeSO₄, la cual permitió observar de manera macroscópica y microscópica que la producción de fenoles se encuentra localizada en la zona de lesión del LChPI (Fig. 30). Asimismo en el LCsPI y en el extremo del cotiledón de la planta control, la tinción para este tipo de compuestos, se observó difundida en toda la estructura cotiledonaria, al igual que en el resto del parénquima, pero en menor intensidad que en el área lesionada del LChPI.

b. DISEÑO SISTÉMICO

En el presente diseño de lesión, tanto las muestras de la planta control como los cotiledones de la planta lesionada, fueron sometidos a las mismas condiciones de tratamiento que el tejido procedente del diseño anterior. Los resultados obtenidos en la lesión sistémica corroboran que en el SChPI se presenta una tinción café alrededor del sitio de lesión; Asimismo también fue posible apreciar la tinción en SCsPI y SCsPs aunque en menor intensidad (datos no mostrados)

LESIÓN CONTRA LATERAL UBICACIÓN DE FENOLES

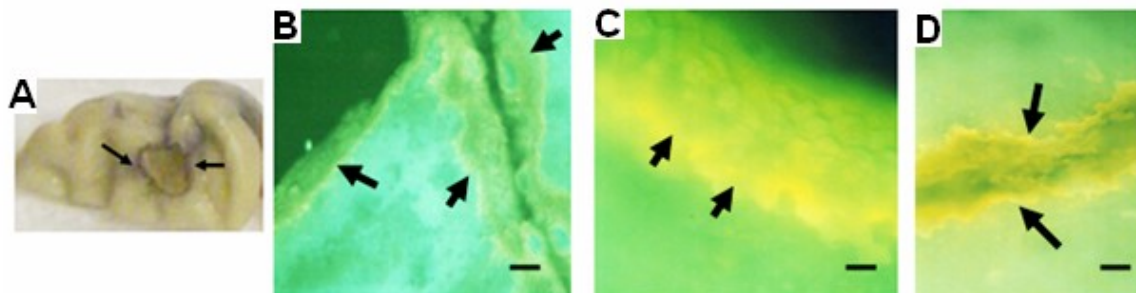


Fig. 30: Ubicación de fenoles, en LChPI, 24 horas posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. La presencia de fenoles fue detectada mediante el reactivo de técnica FeSO_4 (tinción café-ámbar); y observada por microscopía de fluorescencia (B-D), y a nivel macroscópico (A). Las flechas indican la posición de los compuestos fenólicos. Las barras en B equivalen a $1 \mu\text{m}$, y en C y D a $2 \mu\text{m}$.

2. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES

a. DISEÑO CONTRA LATERAL

La realización de una herida en un extremo de ambos cotiledones, a las 48 horas después de iniciada la embibición, dejándose en recuperación hasta completar las 72 horas, reveló que la cantidad de compuestos determinados con reactivo Folín Fenoles en el LCsPI experimenta un aumento del 1.10 veces, y en el LChPI 1.15 veces con respecto al control sin que estos pequeños cambios sean significativos para ambos casos (Fig. 31A) En el caso de los Fenoles en su forma reducida tanto en el LCsPI como en el LChPI se encontró un aumento de 1.2 veces en relación al LCsPs, tampoco en este caso el cambio es estadísticamente significativo (Fig. 31B). En contraste la cantidad de Protoantocianidinas detectadas para el LCsPI presentó un incremento significativo del 21% lo que equivale a 1.20 veces más con respecto al control; y en el LChPI se observó un aumento estadísticamente significativo del 23%, es decir en este caso se experimentó un incremento en la cantidad de protoantocianidinas de 1.23 veces en relación al LCsPs; in embargo entre el LCsPs y el LChPI no se presentaron diferencias significativas (Fig. 31C).

En resumen la cantidad de fenoles detectados con reactivo Folín y fenoles en su forma reducida en el diseño de lesión contra lateral presenta una tendencia a incrementar sus valores en los extremos de los cotiledones de la planta herida, en relación a los extremos de los cotiledones de una planta sana, sin embargo no se exhiben diferencias significativas entre LCsPs, LCsPI y LChPI (Fig. 31A y 31B). Asimismo la cantidad de protoantocianidinas en ambos extremos de los cotiledones de la planta lesionada (LCsPI y LChPI) son significativamente mayor con respecto a las reportadas en el LCsPs (Fig. 31C)

LESION CONTRA LATERAL CUANTIFICACION DE FENOLES

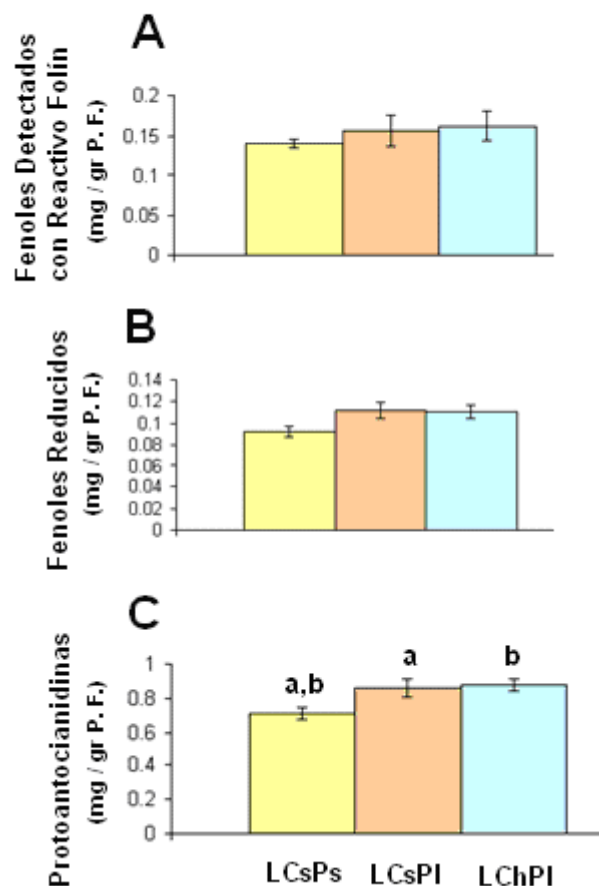


Fig. 31: Cuantificación de Fenoles, 24 horas posteriores a la herida; Diseño Contra Lateral. Se muestra la cantidad de fenoles (mg/ gr P. F.), obtenidos mediante tres métodos: En A por el método Folin, En B con Azul de Prusia para Fenoles Reducidos y en C con Vainillina para Protoantocianidinas; para el LCsPs, el LCsPI y el LChPI. Los resultados expresan la $\bar{X} \pm \text{EEM}$ (n=4), y se señala la significancia $P < 0.05$ de **a-b**. La letra sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.

b. DISEÑO SISTÉMICO

La determinación de Fenoles Totales, Reducidos y de Protoantocianidinas, en este diseño se llevó a cabo siguiendo la misma metodología empleada en el diseño anterior. En este sentido en los tres casos el SChPI reporta las cantidades más altas de fenoles, seguido del SCsPI en comparación con el SCsPs. La cantidad de Fenoles Totales en el SCsPI aumenta 1.12 veces y en el SChPI 1.16 veces, presentándose significancia únicamente en relación a los cotiledones de la planta lesionada y el control (Fig. 32A). La cantidad de Fenoles Reducidos aumenta aún más, ya que en el SCsPI se incrementa 1.24 veces y en el SChPI aumentan 1.6 veces (Fig. 32B). En las protoantocianidinas se registraron valores muy semejantes a los anteriores, acrecentándose en el SCsPI 1.2 veces y en el SChPI 1.6 veces (Fig. 32C). Tanto la cantidad de Fenoles Reducidos como de Protoantocianidinas,

presentaron un aumento estadísticamente significativo en sus valores entre el SCsPI, SChPI y el SCsPs. En todos los casos los datos se encuentran referidos al control.

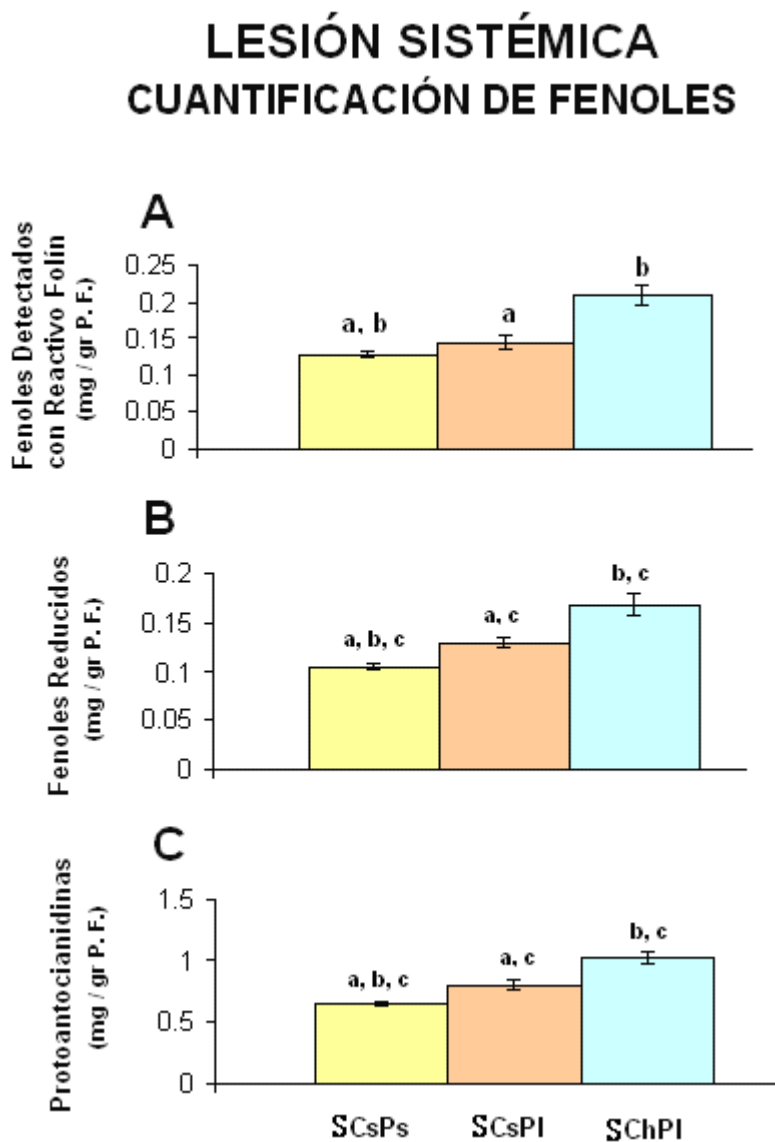


Fig. 32: Cuantificación de Fenoles, 24 horas posteriores a la herida; Lesión Sistémica. Se muestra la cantidad de fenoles (mg/ gr P. F.), obtenidos mediante tres métodos: En A por el método de Folin, En B con Azul de Prusia para Fenoles Reducidos y en C con Vainillina para Protoantocianidinas (C); para el SCsPs, el SCsPI y el SChPI. Los resultados expresan la $\bar{X} \pm EEM$ (n=4), y se señala la significancia $P < 0.05$ de **a-c**. Las letras sobre la barra muestran los cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales

7. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la invasión de malezas como *Ipomoea purpurea* en cultivos básicos en México, causa serios decrementos en la producción cuando no se controlan en los períodos de establecimiento de las plántulas (Agundis, 1984). Los estudios realizados en esta arvense han permitido comprender que muchas de las ventajas adaptativas que le permiten competir exitosamente con los cultivos (Díaz-Pontones y col., 1992), se deben a diversos factores entre los que se encuentran los mecanismos de defensa involucrados cuando la planta esta frente a diferentes tipos de estrés como el daño mecánico.

Los aspectos abordados en el presente proyecto estuvieron enfocados en la respuesta celular y bioquímica que provoca una lesión mecánica a nivel de los cotiledones de *Ipomoea purpurea* a tiempos cortos y largos de recuperación. Observaciones de campo muestran que los cotiledones de esta especie sufren constante daño mecánico provocado por herbivoría, ya que en ellos se almacenan temporalmente sustancias de reserva, además de que son estructuras fundamentales para el establecimiento de la plántula, por tanto deben poseer mecanismos de defensa que le permitan contrarrestar diversos agentes bióticos y abióticos para que la planta logre establecerse y competir con el cultivo que invade.

Estudios previos en el laboratorio, demuestran que después de una lesión, ya sea por golpe o escarificación la planta experimenta un ligero aumento en la actividad de las polifenoloxidasas (PPO) y fenol peroxidasas (POD), encontrándose diferencias entre ellas, a tiempos cortos (0 a 120 minutos) y largos (24 h) de recuperación, con respecto a su control (Díaz-Pontones comunicación personal). Se determinó realizar un daño mecánico más severo que el anterior, realizando la extracción de un cilindro de 1.58 mm de diámetro, para potenciar los efectos de la lesión en los parámetros de interés: producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), actividad de polifenol oxidasa y fenol peroxidasas, así como el aumento de compuestos fenólicos. Por lo tanto se realizaron dos diseños de lesión, el diseño sistémico (lesión en un extremo de uno de los dos cotiledones), en donde se buscó que la lesión fuera “menos severa” en comparación con el diseño contra lateral (perforación en un extremo en ambos cotiledones) donde la lesión debe ser “más severa”.

Por ello hicimos la distinción entre un cotiledón herido que en el caso del sistema contra lateral nos referimos a los extremos perforados de ambos cotiledones (LChPI), mientras el LCsPI consiste en la suma de los extremos no lesionados de los cotiledones de la planta. En cambio en el diseño sistémico se consideró como el SChPI a la unidad funcional y estructural que presentaba una perforación en sólo en uno de sus extremos, mientras que el SCsPI es el otro cotiledón de la plántula al cual no se manipuló experimentalmente. Estos diseños

experimentales nos permitieron determinar el grado de severidad en el daño y además llevar a cabo la comparación del efecto en el extremo contra lateral de la misma unidad estructural. Por otra parte la perforación realizada en uno de los cotiledones nos permitió evaluar las secuelas de la herida en la unidad funcional y estructural de un cotiledón dañado en comparación con el cotiledón de la misma planta que no ha sufrido ninguna manipulación experimental, y a su vez compararlos con los cotiledones de una planta en condiciones normales.

En la lesión contra lateral se observa que la perforación en un extremo de cada cotiledón (LChPI), generó en esa zona una diferencia estadísticamente significativa en peso fresco con respecto a la misma porción de un cotiledón sano (LCsPs), sin embargo la cantidad total de proteína no fue significativamente diferente desde el punto de vista estadístico. Dado que la cantidad de proteína puede ser un indicador de la masa celular, la eliminación de un disco de 1.58 mm genera una diferencia en la masa despreciable y no representa un cambio significativo, puesto que la masa de proteína fluctúa en un mismo valor entre el LCsPs y el LChPI, lo que implica que la diferencia estadísticamente significativa en peso fresco probablemente se deba a la pérdida de agua a través de la herida, aunado a la pequeña masa por la perforación. Si la lesión solamente se realiza en un extremo de uno de los cotiledones (diseño sistémico) no es posible observar entre el SChPI y el cotiledón de la planta sana (SCsPs) diferencias estadísticamente significativas tanto en masa proteica como en peso, lo que indica que este tipo de lesión es “menos severa” que la lesión contra lateral.

Se debe tener en cuenta, que la herida producida por el daño mecánico tanto por depredación como por factores físicos, son condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra en primera instancia la producción de especies reactivas de oxígeno en el sitio del daño, tales como el superóxido y peróxido de hidrógeno (Mittler, 2002; Benezzer-Benezzer y col., 2008). El aumento de ERO se confirma en nuestro estudio haciendo uso de pruebas histoquímicas, mediante las cuales pudo observarse que la producción del H_2O_2 se localizó en el borde de la herida y en las capas profundas a ésta, siendo difusa la tinción a nivel intracelular y en las células que han sido lisadas; mientras que el radical superóxido se situó principalmente en las capas subyacentes a la lesión, en una posición puntual e intracelular.

Es decir se observó que existe una compartimentación a nivel tisular entre estos dos componentes, lo cual indica que el sistema cuenta con una estrategia en el mecanismo de defensa que conduce a una respuesta diferencial en las células que conforman el borde de la herida en comparación a las células de los estratos subyacentes y que se observa por la aparición paulatina de un precipitado blanco fluorescente en las capas subyacentes en donde se localiza el superóxido y el peróxido de hidrógeno. Hasta el momento no se ha identificado la

composición química del precipitado, pero debe poseer una estructura química que le permita la fluorescencia similar al de los productos resultantes de la síntesis de compuestos destinados a la cicatrización de la lesión; sin embargo esta aseveración debe comprobarse mediante una prueba histoquímica específica para corroborar que dicho precipitado puede o no formar una barrera más rígida para prevenir un potencial daño a la planta. Sin embargo se tiene evidencia que el H_2O_2 desempeña un papel muy importante como modulador de los estímulos provenientes de estrés por daño mecánico, ya que induce la expresión de 175 genes (de 11,000 analizados), que participan en la síntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina; además a través de las reacciones de lignificación, suberización, formación de calosa y fenoles que en conjunto participan en el reforzamiento de la pared celular de las plantas que han sufrido una herida (Peña- Cortés y Willmitzer, 1995; May y col., 1998). Lo anterior representa una evidencia bibliográfica de que el componente blanco fluorescente depositado en las capas subyacentes a la herida puede tratarse de un compuesto comprometido para la cicatrización del daño.

Otro de los componentes moleculares de la respuesta inmediata a heridas son las especies reactivas de oxígeno. Por lo que se determinó la “cantidad de superóxido” mediante la reducción de XTT. Los datos obtenidos no coincidieron con lo publicado en la literatura, ya que se reporta que el radical debe aumentar en la planta después de producido un daño (Møller y col., 2007); y en éste estudio se obtuvo una reducción en la cantidad de “superóxido” en el diseño contra lateral comparando el LChPI con el LCsPs, con un decremento del 30 % de O_2° -valor estadísticamente significativo. Al contrastar el LCsPI con el LCsPs la disminución del “superóxido” fue del 50% siendo este porcentaje significativamente diferente desde el punto de vista estadístico.

La disminución estadísticamente significativa en la cantidad de XTT reducido en un 50 % en el LCsPI y en un 30 % en el LChPI denota que el sistema responde a la lesión neutralizando los radicales libres generados por el estrés oxidativo provocado por la herida indicando que el órgano posee un alto poder antioxidante; y que la diferencia del 20 % entre los extremos de los cotiledones perforados se debe a que en el LChPI se puede generar una cantidad de superóxido, ya que al usar el TMP, reactivo quelante o atrapador de superóxido, queló en el diseño contra lateral alrededor del 19% del poder reductor del XTT un valor similar al 20 % de la diferencia señalada anteriormente, sin embargo el TMP tiene la capacidad de quelar a varias especies reactivas de oxígeno, por ello lo anterior debe comprobarse con técnicas más específicas para la cuantificación de éste anión.

Por otro lado la “cuantificación de superóxido” mediante la reducción de XTT en el H.D.T.I. nos permitió inferir que el tiempo de incubación de 20 minutos previa a la homogeneización,

significa la caída en el poder reductor del cotiledón sobre el XTT en el diseño contra lateral del 43 al 50%, lo que implica que en este tiempo de incubación disminuye la capacidad reductora del cotiledón herido en ambos extremos lo que permite deducir que en este tiempo es liberado, sintetizado y ha reaccionado un componente endógeno que se encuentra en forma reducida y que al no ser neutralizada disminuye la capacidad reductora de la estructura hacia el XTT.

No obstante aunque la determinación de superóxido mediante la reducción de XTT ha sido ampliamente usada por diferentes investigadores entre los que se encuentran el grupo de Schopfer y col. (2001) y Liskay y col. (2004); deben tenerse reservas en el empleo de dicha técnica, puesto que controles realizados en nuestro grupo de investigación revelan que las concentraciones usadas en la literatura de CuCl_2 (50 μM), NADPH (200 μM), NADH (200 μM), ácido ascórbico (50 mM) y catequina (5 mM), estos compuestos son capaces de reducir al XTT (Carrillo-Corona comunicación personal). Benova y Fridovich en el 2002 también demostraron que la sal de tetrazolio además puede ser reducida por otros factores como azúcares de cadena corta u otras enzimas que puedan transferir electrones directamente al XTT. Por lo que los resultados obtenidos usando la técnica propuesta por Schopfer y Liskay no corresponden totalmente a la cantidad de superóxido y con ello se observa que nuestro sistema en condiciones nativas cuenta con un alto poder reductor dados los resultados en el LCsPs y en el SCsPs y se debe considerar que los cotiledones en su estado nativo contienen un número considerable de células laticíferas que cuentan en su interior con una gran cantidad de carbohidratos insolubles y proteínas en los cuales se han determinado alto poder reductor (comunicación personal Díaz-Pontones).

Asimismo en el diseño sistémico en general los valores de “superóxido” obtenidos con la técnica de reducción del XTT en la planta lesionada tienden a mantenerse de manera similar que el control, ya que el anión superóxido tanto en el SCsPI como en el SChPI presentan cambios mínimos no significativos en relación al SCsPs. En el caso del SCsPI se observa que dicho cotiledón no se encuentra en estrés oxidativo, ya que los valores de reducción del XTT son muy parecidos a los encontrados en el control, es decir en este caso no es posible quelar al radical con el TMP atrapador específico de superóxido, por tanto éste dato da evidencia de que la reducción del XTT no se debe exclusivamente al O_2^- sino a la capacidad reductora “*per se*” que poseen los cotiledones. Por tanto los datos anteriores apoyan que en el diseño sistémico se produce una lesión “menos severa” en comparación con el diseño contra lateral.

Liskay y col., en el 2004 publicaron que el CuCl_2 en concentración de 30 μM , es un quelante eficiente del radical superóxido. Sin embargo en la literatura también se encuentra citado desde hace varios años, que el cobre es un metal tóxico para las plantas, ya que disminuye la

producción de azúcares libres, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la fotosíntesis (Barón, 1995); y en consecuencia sobre el metabolismo activo de los carbohidratos, el cual está implicado en todas las actividades de biosíntesis y conservación de la planta (Kramer y Kozlowski 1979). Del mismo modo se ha reportado que el cobre tiene la capacidad de afectar la función bioquímica de compuestos antioxidantes, tal es el caso del ácido ascórbico el cual en presencia de este elemento puede catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno, función contraria a la que desempeña el ascórbico de manera aislada (Halliwell y Gutteridge, 1985). Lo anterior se ve reflejado en los resultados obtenidos de las muestras de LCsPI y LChPI tratadas con CuCl_2 , en las cuales se observa que dicho compuesto a la concentración sugerida no presenta el efecto quelante del “superóxido” como se reporta en la literatura, ya que no se observan cambios en presencia o ausencia de CuCl_2 por lo que induce a pensar que tiende por un lado a quelar el superóxido y por otro a aumentar la producción del radical lo que implica que el CuCl_2 en el cotiledón este generando estrés oxidativo.

Las plantas al estar expuestas a diferentes factores estresantes deben de contar con mecanismos endógenos que les permitan mantener la cantidad de peróxido de hidrógeno y superóxido en un intervalo de concentración adecuada para conservar su homeostasis interna y de esta forma poder tolerar el estrés, ya que si se produjera un aumento de ERO y de sus intermediarios en toda la estructura del vegetal se podría derivar en la muerte del órgano y con ello de la planta. Por tanto las plantas han desarrollado mecanismos de detoxificación del radical superóxido, ya sea por una reacción no enzimática o mediante la acción de metaloenzimas como la superóxido dismutasa, la cual transforma éste anión en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, así mientras más superóxido se produzca mayor cantidad de H_2O_2 se formará (Møller y col., 2007). Lo anterior resulta consistente con los datos arrojados del análisis cuantitativo de peróxido de hidrógeno mediante la titulación con permanganato de potasio, ya que en este estudio en el diseño contra lateral se presentó un descenso en la cantidad de peróxido de hidrógeno en donde comparando el LChPI con el LCsPs se obtuvo un decremento de alrededor del 14.06 % y al contrastar el LCsPI con su respectivo control se encontró una disminución de aproximadamente 17.48 %, en ambos casos los porcentajes no son significativos. En el caso del diseño sistémico también se observó un decremento del 9.79 % entre el SCsPI con respecto a SCsPs, sin ser éste valor significativo; no obstante cuando se contrasta el SChPI con su respectivo control se registra una ligera tendencia de aumento del 15.44 %, aunque este dato tampoco es significativo desde el punto de vista estadístico.

Los valores anteriores muestran que si bien los cotiledones de la planta herida se encuentran en estrés oxidativo, la cantidad de peróxido de hidrógeno detectada en los cotiledones de la planta herida tanto en el diseño contra lateral como en el diseño sistémico, posee un patrón semejante

al obtenido en la planta testigo, puesto que dichas estructuras deben contar con mecanismos de protección para disminuir el potencial tóxico de este intermediario de la familia de las ERO y de esta forma proteger a la estructura cotiledonaria de la reactividad del peróxido de hidrógeno e impedir posteriores daños al ADN, proteínas y lípidos. Es decir este intermediario puede estarse degradando mediante mecanismos de destoxificación no enzimáticos, en donde se encuentran involucrados compuestos antioxidantes de bajo peso molecular, como los fenoles, además también la acción de enzimas como las polifenol oxidasas o fenol peroxidasas (Gossett y col., 1994), pueden ser factores causales de que la detección de niveles de peróxido de hidrógeno en la planta lesionada sean muy similares a los reportados en la planta control. Otra explicación a éste fenómeno está dada en función de que el peróxido de hidrógeno en presencia de fierro puede transformarse en el radical hidroxilo (Møller y col., 2007). Asimismo debemos tomar en cuenta que sin bien la cantidad de “superóxido” obtenida en ambos diseños fue similar o significativamente menor al encontrado en los controles, resulta evidente que éstos bajos niveles del radical al ser transformados en peróxido de hidrógeno también deben representar un valor muy parecido a los encontrados en los cotiledones de la planta sana.

Sin embargo la tendencia de aumento de peróxido de hidrógeno en el SChPI con su respectivo control en cero, veinte y treinta minutos después de realizada la perforación concuerda con lo actualmente reportado en la literatura sobre éste intermediario, donde se muestra que en los vegetales expuestos a diferentes tipos de estrés, existe un incremento de peróxido de hidrógeno, ya que dentro de sus funciones esta actuar como una molécula que transmite las señales exteriores al interior de la célula (Neil y col., 2002), puesto que al ser un compuesto oxidante más estable que el superóxido puede atravesar la bicapa lipídica de las membranas celulares del parénquima contiguo, debido a la ausencia de carga eléctrica de su molécula, y actuar como segundo mensajero intra o intercelular (Pitzschke y Hirt, 2006; Van Breusegem y Dat, 2006).

Debe descartarse que la falta de significancia estadística en las cantidades de peróxido de hidrógeno encontradas en los cotiledones de la planta lesionada en relación con los cotiledones de la planta control, se deba al método de determinación de peróxido de hidrógeno con KMnO_4 acoplado a la espectrofotometría, ya que en nuestro grupo de investigación se ha mostrado una resolución en la detección de H_2O_2 de 44 nanomolas/mL en relación con la técnica más sensible mediante fluorescencia utilizando diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF) como reactivo, que es de 1 nanomol/mL (Hawes y Satiat-Jeunemaitre, 2001), pero aunque la determinación con KMnO_4 es 44 veces mayor, ha permitido detectar variaciones importantes en otros modelos biológicos como el maíz.

Debe tomarse en cuenta que los valores resultantes de la cuantificación de “superóxido” y peróxido de hidrógeno en ambos diseños de estudio se refieren a los obtenidos en toda la estructura cotiledonaria y no concretamente el producido en el lugar del daño; se debe considerar además que la vida media de las especies reactivas de oxígeno es muy corta, tal como una millonésima de segundo (Murray y col., 1993). Asimismo la perforación dentro del cotiledón pudo haberse realizado muy cerca de la vena central o bien directamente en dicha estructura lo cual representa en el segundo caso un daño más substancial que en el primero. Aunado a esto hay que considerar la variabilidad del material biológico que si bien proviene de la misma cosecha éstas semillas varían en cuanto al peso seco puesto que en los primeros lotes era bastante homogéneos debido a la disposición de semillas, con el transcurso de los experimentos el reservorio de éstas fue decreciendo y aunque el rango del peso era el mismo (20 a 23 mg), la selección fue menos estricta, obteniéndose de esta manera lotes con pesos más heterogéneos; lo cual puede ser otra causa, de que los resultados obtenidos en algunos casos no presentan significancia estadística debido a la dispersión de los datos.

Se observó que la generación de una herida en un extremo del cotiledón induce el aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes. Alrededor de la lesión se identificó tanto la actividad de oxidasa que utiliza catequina como sustrato, como de peroxidasas que consumen tanto catequina como guayacol y/o AEC como sustrato, indicando que estas enzimas se encuentran reactivas en la zona de daño. La presencia “*in situ*” de estas enzimas correlaciona con el aumento cuantitativo de su actividad de tal forma que en la lesión contra lateral la catequin oxidasa (Cox) se incrementó en el LCsPI 25 veces y en LChPI 20 veces, en relación a la actividad obtenida en la planta control, esto indica que existe una alta actividad enzimática inducida después de veinticuatro horas de realizada la lesión. De la misma forma la catequin peroxidasa (Cpx) en el diseño contra lateral presenta un aumento significativo en su actividad en el LCsPI de 3 veces y en el LChPI de 2 veces, en relación a la planta testigo, además existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos extremos de los cotiledones de la planta herida en la actividad de Cpx, si ésta se expresa como actividad específica siendo en este caso el parámetro más adecuado para señalar los cambios inducidos por la herida. Dicha diferencia significativa en la actividad de Cpx puede explicarse parcialmente debido a la inducción en el LChPI de una isoenzima con punto isoeléctrico (pI) 7.3, sin encontrar ninguna divergencia en el patrón de aparición en el resto de las isoenzimas en éste diseño; indicando que los cambios en las actividades entre los extremos de los cotiledones de la planta perforada con respecto a sus contrapartes de la planta sana, se debe en mayor medida al incremento inducido en la actividad de las isoenzimas constitutivas. En publicaciones recientes se ha hecho referencia a la inducción de isoenzimas de fenol peroxidasas en *Ipomoea batata*, ésta planta pertenece a la misma familia y al mismo género que *Ipomoea purpurea*, por tanto posiblemente en ambas plantas se lleve

acabo una respuesta diferencial al estrés abiótico, ya que en la planta del camote se presentan cambios en la expresión de 10 genes, siendo los principales swpb1, swpb2, y swpb3, lo cual indica que algunas isoenzimas de fenol peroxidasa, posiblemente participan en mecanismos específicos de defensa contra el estrés oxidativo inducido por diferentes tipos de estrés en plantas de camote (Yun-Hee Kim y col., 2007).

Cuando se utilizó guayacol como sustrato de la peroxidasa no se mostraron cambios significativos a pesar de ser la enzima con mayor actividad y que se haya presentado en el LChPI una isoenzima con pI de 7.3 con actividad de catequina y guayacol. Sin embargo aunque no se encontraron diferencias significativas en la Gpx se observa que en el LCsPI existe el mayor valor medio para esta enzima con respecto al LCsPs y al LCsPI. La falta de significancia estadística en los resultados de Gpx implica que la inducción de esta enzima mediante una herida es muy pequeña en comparación con la actividad total, ya que de las tres enzimas determinadas es la que posee la mayor actividad debido a ello su cambio de actividad parece despreciable. Así en este trabajo Gpx parece ser una enzima poco inducible por estrés mecánico, ya que aumenta su actividad en muy bajas proporciones con respecto a Cox y Cpx. Probablemente existan diferencias a nivel biológico entre la cantidad de peroxidasa solubles, puesto que se ha reportado que después de un estrés por daño mecánico la Gpx incrementa su actividad enzimática ya que es un componente importante de la respuesta de defensa mediada por peroxidasa, por tanto el guayacol ha sido ampliamente utilizado como sustrato para determinar la actividad de peroxidasa (Minibayeva y col., 2003; Chandra y Dubey, 2009; Ranger y col., 2009), por ello en este estudio la dispersión de los resultados de las actividades obtenidas en el uso de guayacol, asociados con la variabilidad que representa el sitio de lesión puede estar enmascarando esta probable diferencia, por ende a futuro debe considerarse si realmente existen estos pequeños cambios los cuales deben llevarse a cabo en la zona de lesión como indica las pruebas histoquímicas y que por ello no impacte en el total de la actividad enzimática de la estructura.

La actividad en el diseño sistémico indica que la herida induce después de 24 horas de realizada la perforación un incremento en la actividad tanto de oxidasa como de la peroxidasa que emplean como sustrato a la catequina, tanto en el SChPI como en el SCsPI en comparación con los cotiledones de una planta sana. Los resultados obtenidos para Cox en el SChPI demostraron que esta enzima es significativamente 6 veces más activa en el SChPI y 2 veces en el SChPI en con respecto al testigo; mientras que en la catequin peroxidasa se observa un cambio significativo en su actividad de 3 veces en el SChPI y de 2 veces en el SCsPI, con respecto SCsPs. De esta manera nuevamente se corrobora que el daño que se produjo con este diseño experimental es “menos severo” o de menor intensidad que el daño producido en el diseño

contra lateral, dado que el cambio en la actividad de Cox es mucho menor en este diseño de lesión. Se observa que si bien ambas actividades (Cox y Cpx) son estadísticamente significativas con respecto al control la Cox es la que en este caso muestra significancia entre los cotiledones de la planta lesionada, siendo mayor la actividad en el cotiledón dañado (SChPI). La diferencia encontrada entre los dos cotiledones puede deberse a la desaparición de una isoenzima con punto isoeléctrico 5.1 que tiene actividad de catequin peroxidasa y que únicamente se presenta en el SCsPs, simultáneamente existe una aparición de una isoenzima de catequin oxidasa con punto isoeléctrico de 4.8 en el SChPI indicando que la actividad de esta enzima debe ser mayor en dicho cotiledón. Hay que hacer mención de una isoenzima con punto isoeléctrico de 6.5 con actividad de catequin oxidada y catequin peroxidasa, la cual se presenta en el SCsPs y en el SCsPI sin que tenga actividad en el cotiledón herido, sin embargo cuando se utiliza guayacol o AEC dicha enzima además aparece en el SChPI, lo que implica que para determinar la participación de cada isoenzima y que esto se vea reflejado en las proporciones de las veces actividad es necesario llevar a cabo un estudio cuantitativo de la actividad de cada isoenzima, por ello se debe tomar en cuenta que las diferencias detectadas en los resultados obtenidos deben provenir no sólo del aumento de la inducción por lesión mecánica, sino también por el incremento de la actividad de las enzimas constitutivas existentes.

Los resultados anteriores sugieren que al ser sometidos a un daño los cotiledones de *I. purpurea* aumentan la actividad enzimática preferentemente de Cox seguida de la actividad de Cpx, posiblemente debido a que el estrés mecánico en la plántula, desencadena una cascada de reacciones que incrementan la expresión de las polifenol oxidasas y la fenol peroxidadas para la defensa ante algún agente externo, por lo que se puede sugerir que el daño producido en los cotiledones actúa como un inductor positivo de la actividad enzimática, confirmando así lo reportado en la literatura en donde se muestra que al realizar un daño mecánico por tensión en los márgenes de las hojas de *Vigna unguiculata*, existe un aumento en la actividad de polifenol oxidasas siendo éste 13 veces mayor en la zona de lesión y 15 veces en la zona aledaña, 48 horas después de provocado el un daño mecánico (Márcio y col. 2008). Asimismo en las hojas de *Lycopersicon esculentum* lesionadas también por presión mecánica se ha reportado un incremento de 18 veces la actividad de polifenol oxidasas en la planta dañada en comparación con su control (Constabel et al., 1995). Santosh y col., y Yun-Hee Kim y col., en el 2007 publicaron que en las hojas de *Ipomoea batata* expuestas a diferentes tipos de estrés abiótico, la actividad de fenol peroxidadas se incrementa 7 veces cuando la planta es expuesta a 500 ppb de SO₂ durante 8h, 3 veces si se somete a 200 ppb de O₃ por 8 horas y 2 veces si se irradia con luz UV-B por un lapso de 12 horas; en todos los casos las hojas dañadas fueron comparadas con una referencia.

La diferencia en la significancia entre las actividades de las enzimas que emplean catequina como sustrato (Cox y Cpx) y las que emplean guayacol (Gpx), implica el papel diferencial entre ambos grupos de enzimas haciendo evidente que el aumento en la actividad tanto de polifenol oxidasas como de fenol peroxidasas, resulta necesario, puesto que son enzimas que participan en diferentes procesos fisiológicos de la planta, como la lignificación, la suberización, la formación de papilas de calosa, el catabolismo de auxinas, los mecanismos de respuesta contra patógenos y contra daños mecánicos; éstos procesos inducen diferentes isoformas que varían tanto en la secuencia como en la función de la enzima (Kawano, 2003). Estos cambios en las actividades indican el importante papel que juega el uso de la catequina y las enzimas relacionadas con el empleo de dicho sustrato en los mecanismo de defensa; ya que se ha observado que esta protoantocianidina resulta ser un buen sustrato para algunas polifenol oxidasas y fenol peroxidasas (Kinsella y col., 1993). La catequina además está clasificada como una sustancia antioxidante, puesto que se encuentra presente de manera natural en las semillas de las monocotiledóneas y dicotiledóneas, realizando una acción quelante de metales en transición y de radicales libres mediante la formación de estructuras menos reactivas (Taiz y col., 2006). También esta protoantocianidina así como la Cox y la Cpx pueden estar participando de manera directa en la generación de polímeros que funcionen en los mecanismos de defensa como sustancias astringentes, barreras mecánicas y/o químicas, ya que tanto polifenol oxidasas como fenol peroxidasas juegan un papel muy importante en la defensa de la planta debido a la oxidación de los componentes fenólicos endógenos a quinonas, las cuales son moléculas altamente tóxicas, empleadas en la defensa contra herbivoría, ya que el resultado de las quinonas puede experimentar una autopolimerización no enzimática o covalente en el intestino del depredador (Tomas-Barberan y Espín, 2001; Hagerman y Butler, 1981).

La catequina también se encuentra involucrada en los mecanismos de protección en las hojas de Té verde ante el estrés lumínico en donde se induce un daño por especies reactivas de oxígeno (Reich y col., 2008); de forma similar en este estudio la catequina puede estar actuando en la regulación del estrés oxidativo producido en cotiledones al ser expuestos a una lesión mecánica (como lo muestra la tinción “*in situ*” de ERO), para mantener los niveles de peróxido de hidrógeno dentro de un intervalo fisiológicamente adecuado puesto que minutos después de producida una herida se lleva acabo la generación de especies reactivas de oxígeno en la zona de lesión por lo que durante la primera hora después de provocada la lesión, se observa un aumento en la producción de ERO en lo que se conoce como fase inicial transitoria. Sin embargo después de este tiempo, si no se cuentan con sustancias antioxidantes como fenoles, así como enzimas que utilicen éstos compuestos como sustratos, se presenta una acumulación de ERO y de sus intermediarios en el área lesionada; mientras que en presencia de enzimas y

compuestos fenólicos con actividad antioxidante, los niveles de ERO se mantienen bajos en el sitio de lesión (Mittler y col., 2004).

Lo anterior se encuentra apoyado por la colocalización espacio-temporal entre los fenoles y la actividad de oxidasas y peroxidasas que usan como sustrato a la catequina en la zona de daño en ambos diseños de lesión, lo cual indica que inmediatamente después de producida la herida las ERO generadas en el sitio de perforación posiblemente están implicadas en la actividad enzimática y la deposición de fenoles presentes 24 horas después en el borde y las capas subyacentes de la lesión, lo cual coincide en cierta forma con la ubicación de superóxido pero fundamentalmente con la de peróxido de hidrógeno, esto concuerda con lo observado en hojas de encino expuestas a herbivoría, las cuales producen H_2O_2 en la zona de lesión y en las células guarda de los estomas (Ruuhola y Yang, 2006), y se ha planteado que el H_2O_2 puede ser capaz de translocarse por el xilema y actuar como señal para controlar el movimiento de los estomas (Songjie y col., 2006); pudiendo ser este intermediario capaz de inducir genes que codifican enzimas antioxidantes como las polifenol oxidasas y las fenol peroxidasas (Desikan y col., 2001). Asimismo las polifenol oxidasas pueden promover la actividad de las fenol peroxidasas por la generación de H_2O_2 proveniente de la oxidación de los componentes fenólicos (Richard-Forget y Gaulliard, 1997). Además la expresión de genes de defensa no sólo es regulada por este intermediario, sino también por moléculas tales como el ácido salicílico, el ácido jasmónico, el etileno, modulando así la expresión de los genes de las enzimas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios como son los compuestos fenólicos, los cuales son importantes en la respuesta de defensa de las plantas, puesto que restringen el sitio de lesión reforzando a su vez la pared celular (García- Ponce y Rocha Sosa, 2000; Wasternak y Parthier, 1997). Por otra parte los fenoles presentan capacidad antioxidante la cual contribuye al mantenimiento del estado de óxido-reducción de la célula vegetal. Esto explica que el aumento estadísticamente significativo de protoantocianidinas entre los extremos de los cotiledones de la planta lesionada y los extremos de los cotiledones de la planta testigo sea de 1.2 veces, sin que se presenten diferencias significativas entre el LCsPI y el LChPI; dicho aumento del 20% se refleja en los cambios que existen en los fenoles reducidos, es de llamar la atención que el grupo de fenoles que cambian por efecto de la lesión sean las protoantocianidinas y que indirectamente estén indicando que se encuentran en estado reducido por el 20 % antes mencionado, de tal forma se evidencia que en el sitio de la lesión después de 24 horas se induce un aumento tanto en la actividad oxidativa y peroxidativa que utiliza como cosustrato a la catequina.

El cambio mayoritario en la cantidad de fenoles se observó durante la determinación de la cantidad de protoantocianidinas en el diseño sistémico, en donde de manera similar al sistema contra lateral se experimentó un cambio del 20% entre las protoantocianidinas y los fenoles

reducidos de el SCsPl con respecto a el SCsPs, corroborando parcialmente lo que anteriormente se discutió, pero en este caso el cambio en el SChPl con respecto al control el cambio por efecto de la lesión es del 60% tanto en fenoles reducidos como en protoantocianidinas; es decir en este diseño el aumento de este tipo de fenoles es considerablemente mayor en el SChPl en relación al obtenido en el diseño contra lateral; esto implica que después de 24 horas de realizada la herida la planta es capaz de inducir la síntesis de *novoo* de protoantocianidinas y que en el caso de esta lesión “menos severa” en donde únicamente se daña un extremo de un cotiledón induce un incremento de 1.6 veces la cantidad de fenoles tipo catequina y que éstos permanecen en su mayoría en forma reducida en el cotiledón lesionado; mientras que en el daño “más severo”, como el que se presenta en los extremos de ambos cotiledones heridos, se lleva a cabo una respuesta que involucra el empleo y/o transformación en mayor medida de fenoles en su estado reducido mediante su oxidación y/o peroxidación y con ello su polimerización.

Probablemente este efecto se deba a que la extracción etanólica permite solamente obtener fenoles de alta y mediana polaridad, más no fenoles de menor polaridad o los polímeros de los mismos. Es decir si en el caso de una lesión “más severa” se debe de inducir una barrera física para sellar el sitio de lesión, algunos de estos fenoles solubles, ya habrían sido transformados en sus polímeros correspondientes o taninos condensados y por ello no podrán extraerse. Por tanto se puede estar facilitando la polimerización de los fenoles cambiando su solubilidad y por ello no es posible extraerlos con agua-etanol. Estos polímeros pueden ser derivados de la oxidación y peroxidación de la catequina como medio para evitar el estrés oxidativo a largo plazo y/ o bien la generación de polímeros de taninos condensados que generen una astringencia como mecanismo de defensa cuando la estructura es dañada mecánicamente. Aunque lo anterior debe ser comprobado con estudios posteriores, existe un experimento preliminar en donde el tejido fue teñido con vainillina reactivo que detecta protoantocianidinas y el color café-magenta resultante alrededor del sitio de lesión correlaciona con la tinción azul del FeSO_4 .

Los cambios en la cantidad de fenoles reducidos y protoantocianidinas, así como la actividad oxidativa/peroxidativa entre los cotiledones de la planta lesionada indican que cuando existe una lesión se activan los mecanismos enzimáticos que desembocan en la producción de compuestos fenólicos, siendo ésta activación poco específica en la lesión “menos severa” o lesión sistémica en el SCsPl, puesto que en este caso se observa que todos los compuestos fenólicos aumentan su cantidad significativamente; sin embargo en un daño “más severo” como el realizado en la lesión contra lateral, se aumentan específicamente protoantocianidinas, no obstante el aumento mayoritario de éstos compuestos se presentó en el diseño sistémico, lo cual puede deberse a que en el SChPl donde únicamente se ha llevado a cabo una perforación el cotiledón detecta un daño inicial y por tanto envía masivamente al sitio de lesión éstos fenoles

que al estar involucrados en la respuesta inmediata de las plantas ante un estrés, principalmente cuando se ha provocado el ataque de insectos y plagas, puesto que éstos compuestos son altamente tóxicos y difícilmente digeribles para los microorganismos, y de esta manera evitar un ataque posterior en el resto de la estructura, es decir cuando la plántula es dañada, se desencadena inmediatamente una serie de reacciones de hipersensibilidad para que se genere en la zona lesionada moléculas y compuestos que restrinjan la expansión del daño y así aislarlo del resto de la planta, además de proteger a las células contiguas y los tejidos distantes al sitio de la lesión (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Darren y col., 2002). Esta capacidad de las células para repeler los ataques subsecuentes, se dispersa a través de toda la planta, produciéndose así la llamada resistencia sistémica adquirida (Cámarena-Gutiérrez y col., 2007).

Por tanto el aumento de fenoles en el LCsPI y el SCsPI posiblemente sea el resultado de un mecanismo preventivo, para evitar que la zona de daño se incremente, y de este modo mantener el cotiledón funcional, por ello las plántulas tratan de restringir el daño a la zona de impacto, para mantener su metabolismo. De manera reiterativa, nuevamente se muestra que la intensidad de la lesión en la planta, representa un factor determinante en la intensidad de la respuesta de defensa. Sin embargo en los dos diseños de lesión el cambio significativo en la producción de protoantocianidinas grupo al que pertenecen las catequinas, representa un dato relevante para este estudio, ya que éstos compuestos pueden estar actuando como sustratos endógenos de las polifenoloxidasas y fenol peroxidasas propuestas en el proyecto, o bien constituir un componente de la barrera física y química debido a la astringencia que presentan.

Lo anterior corrobora que el aumento de los niveles constitutivos de compuestos fenólicos, sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico (Wink, 1999). Sumado a esto, se sabe que en *Malus domestica*, durante la herbivoría real o simulada o durante estrés térmico, se induce el gen DFR-BAN, que al parecer codifica para la leucoanthocianidina reductasa, enzima que sintetiza a *trans* flavan-3-ols [catequina (2-3-*trans*)] (Devic y col., 2009); también se tiene registros de que en plantas de encino que presentan herbivoría existe un aumento, de los niveles de ARNm de DFR de 7 a 10 veces con respecto al control (Darren y col., 2002). Constabel y cols, en el 2000 reforzaron esta idea, ya que demostraron que después del ataque de herbívoros en *Populus tremuloides*, se induce la actividad de las polifenoloxidasas en toda la planta dañada, además de que existe una mayor acumulación de transcritos del gen de la catequina oxidasa en las células de la planta dañada en relación a la planta intacta. De este modo se refuerza la hipótesis de que las catequinas, pueden estar actuando como sustratos de enzimas como las polifenol oxidasas y fenol peroxidasas, cuya síntesis puede estar siendo regulada por ERO, para actuar como agentes reductores o bien

contribuir con otros sistemas de detoxificación para la generación y amplificación de otras señales.

Por ello, sería recomendable estudiar a más detalle, la actividad enzimática de la catequin oxidasa y catequin peroxidasa, caracterizar a las isoenzimas inducidas por daño mecánico en cuanto a su pH óptimo, su constante de afinidad (K_m), inhibidores (K_i), peso molecular específico para corroborar cuantitativamente que función tienen en el aumento en la proporción de la actividad enzimática. Asimismo se debe llevar acabo la cuantificación de la producción de fenoles a tiempos cortos de recuperación. Igualmente la cuantificación de superóxido debe efectuarse mediante una técnica más sensible y determinar la cantidad en ambos diseños la presencia de otros compuestos que pudiesen interferir con la reducción de XTT, aparte de cuantificar los niveles de ERO, 24 horas después de la herida, ya que resultan realmente promisorios dichos análisis.

8. CONCLUSIONES

A. DISEÑO CONTRA LATERAL

- El diseño de lesión contra lateral, mostró ser un buen modelo de estudio para comprender los mecanismos involucrados en la defensa de las plantas, ya que al perforar un extremo en ambos cotiledones, se ocasiona un daño “más severo” en comparación con el diseño sistémico, el cual puede potenciar los efectos de la lesión en los parámetros de interés.
- La cantidad del radical superóxido reporto una disminución significativa tanto en el LCsPl como en el LChPl, con respecto al control a tiempos cortos de recuperación.
- Cox presentó una actividad enzimática entre 20 y 25 veces mayor en el LCsPs vs LChPl y en el LCsPs vs LCsPl respectivamente, en comparación con Cpx 2 y 3 veces y Gpx 1 a 1.5 veces a nivel de estructura, peso fresco y actividad específica.
- La actividad enzimática de Cox y Cpx aumenta, mientras que la de Gpx permanece sin cambios significativos, por tanto en este caso Cox y Cpx son enzimas inducibles; mientras que Gpx es una enzima constitutiva.
- Se reportaron 8 isoenzimas: tres alcalino-neutras y cinco con pI ácidos.
- El daño mecánico induce una isoenzima con pI 7.3 en el LChPl.
- Los niveles de Protoantocianidinas en los cotiledones de la planta lesionada fueron superiores, a los reportados en el los extremos de los cotiledones de la planta control.

B. DISEÑO SISTÉMICO

- El Diseño de lesión sistémica, constituye un modelo menos sensible, para estudiar los mecanismos de protección en una planta, ya que al lesionar sólo un extremo de uno de los dos cotiledones, se ocasiona un daño “menos severo” con respecto al diseño contra lateral, el cual puede enmascarar e incluso omitir, algunas respuestas involucradas en los mecanismos de protección de la planta.
- Cox presentó una actividad enzimática entre 2 y 6 veces mayor en el SCsPs vs SCsPl y en el SCsPs vs SChPl respectivamente, en comparación con Cpx que es de 3 a 2 veces y Gpx es de 1.5 y 1.7 veces a nivel de estructura, peso fresco y actividad específica.
- La actividad de Cox, Cpx así como la de Gpx se vio aumentada, por ello en este tipo de lesión, las tres enzimas son inducibles.
- Se reportaron 8 isoenzimas; dos alcalino-neutras y seis con pI ácidos
- El daño mecánico es capaz de inducir en Cox y AECpx, una isoenzima con pI 4.8, en el ChPl.

- La cantidad de fenoles detectados con reactivo de Folín obtenidos en ambos cotiledones de la planta lesionada, presentó un aumento significativo con respecto al control.
- La cantidad de Fenoles Reducidos, mostró un aumento significativo en los cotiledones de la planta lesionada, siendo los valores más altos en el SChPI, seguidos del SCsPI, con respecto al control.
- El nivel de Protoantocianidinas en los dos cotiledones de la planta lesionada, presentó un incremento significativo en relación a la referencia, siendo mayores los valores en el SChPI, seguidos de el SCsPI.

C. AMBOS DISEÑOS

- La intensidad del daño en la planta, determina la magnitud de las respuestas de defensa del vegetal.
- La producción de ERO y sus intermediarios a tiempos cortos de recuperación posiblemente puede inducir, 24 horas después la actividad de enzimas como Cox, Cpx y Gpx, así como la cantidad de sus sustratos.
- La producción de H₂O₂ en los Cotiledones de la planta sana no presentó cambios significativos con la cantidad de H₂O₂ producida en los cotiledones de la planta Lesionada.
- El tratamiento con CuCl₂, no presenta efecto de inhibición de superóxido, e incluso al parecer aumenta su producción.
- Se observan cambios significativos en la actividad enzimática de Cox, seguida de Cpx, a tiempos largos de recuperación.
- La actividad enzimática/proteína y actividad enzimática/peso fresco, fueron los parámetros más óptimos para expresar la actividad de Cox, Cpx y Gpx.
- La diferencia en cuanto a las veces actividad enzimática de Cpx comparada con las veces actividad de Gpx, denotan que ambas proteínas a pesar de ser peroxidasa, realizan funciones distintas, tanto en la lesión contra lateral, así como en la lesión sistémica, durante la recuperación larga.
- Se observo la formación paulatina de un precipitado color blanco fluorescente, depositado alrededor del sitio de lesión y en las zonas contiguas a la herida, el cual posiblemente este destinado a formar una barrera física para evitar que la zona de daño se incremente.
- La cantidad de protoantocianidinas en el SChPI fue mayor en comparación con el LChPI probablemente debido a que la extracción etanólica permite solamente extraer fenoles de alta y mediana polaridad, más no fenoles de menor polaridad o polímeros de los mismos.
- La actividad enzimática, la producción de H₂O₂, superóxido y la acumulación de compuestos fenólicos se encuentra localizada en el cotiledón herido alrededor del sitio de la lesión y en las zonas aledañas a la herida.

9. PERSPECTIVAS

Para obtener un esquema más completo sobre los mecanismos de defensa que presenta la plántula de *Ipomoea purpurea* en condiciones de estrés causado por daño mecánico, en futuras investigaciones en ambos diseños es necesario indagar en el comportamiento de la actividad enzimática y la cantidad de compuestos fenólicos a tiempos cortos de recuperación (5, 30 y 120 minutos) y determinar la producción de especies reactivas de oxígeno a tiempos largos de recuperación (24 hrs) después de provocada la lesión.

Igualmente se debe caracterizar a las isoenzimas inducidas por daño mecánico en cuanto a su pH óptimo, su constante de afinidad (Km), inhibidores (Ki), peso molecular específico para corroborar cuantitativamente que función tienen en el aumento en la proporción de la actividad enzimática. Por otro lado la cuantificación de superóxido debe efectuarse mediante una técnica más sensible y determinar en ambos diseños la cantidad y la presencia de otros compuestos que pudiesen interferir con la reducción de XTT.

Del mismo modo resulta importante establecer el papel que juegan ciertas hormonas vegetales como el ácido salicílico y el ácido jasmónico, tanto de manera independiente como en combinación, sobre la localización y el efecto de ERO, la actividad de catequin peroxidasa, catequin oxidasa, guayacol peroxidasa y la acumulación de fenoles a tiempos largos de recuperación, después de una lesión por herida en los cotiledones.

Asimismo convendría analizar la participación de otros mecanismos reguladores de protección celular de los vegetales contra el estrés oxidativo, tales como la vía ascórbico/glutación, la intervención de enzimas claves en la síntesis de compuestos fenólicos como la fenilalanina amonoliasa (PAL); utilizando herramientas a nivel celular y molecular que permitan dilucidar los mecanismos y estrategias bioquímicas que esta especie a desarrollado como proceso de adaptación al medio. Dichos estudios podrán aportar nuevos conocimientos para obtener una mejor comprensión de los mecanismos de regulación de defensa en plantas silvestres que favorezcan a corto y largo plazo el control de este tipo de malezas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agundis O. (1984). Inia. Sarh. México.
2. Anaya A.L. (2003). Ecología Química. Plaza Valdez. p. p. 349
3. Apel K y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55 , 373-399.
4. Benezzer-Benezzer, Castro-Mercado García-Pineda. (2008). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas *Revista Mexicana de Fitopatología*, enero-mayo, año/vol. 26, número 001. pp. 56-61
5. Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, Kloareg B, Salaün JP, Potin P. (2004). The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiol*. 135(3):1838-48.
6. Boudet A.M. (2003). Towards and understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. In: *The plant cell wall. Annual Plant Reviews. Vol 8. Ed. J. K. C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford*, pp. 185-192.
7. Buchanan, Gruissem, Jones R. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants: "Natural Products (Secondary Metabolites)". American Society of Plant Physiologists. E.U.A. Capítulo 21 y 24.*
8. Camarena Gutiérrez y De la Torre Almaráz. (2007). Resistencia Sistémica Adquirida en Plantas: Estado Actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, julio-diciembre, año/vol. 13, número 002. pp. 157-161
9. Cosgrove DJ. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(11):850-61
10. Chandra A, Dubey A. (2009). Effect of ploidy levels on the activities of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase, superoxide dismutase and peroxidase in *Cenchrus* species grown under water stress. *Plant Physiol Biochem*. [Epub ahead of print]
11. Darren J. Peters1 and C. Peter Constabel. (2002). Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *The Plant Journal* 32, 701–712
12. Dawson, JM y Heatlie, PL (1984). The Lowry method of protein quantification: evidence of photosensitivity. *Anal. Biochem*. 140 (2), 391-393
13. Devic E, Guyot S, Daudin JD, Bonazzi C. (2009). Effect of Temperature and Cultivar on Polyphenol Retention and Mass Transfer during Osmotic Dehydration of Apples. *J Agric Food Chem*. Dec 2. [Epub ahead of print]
14. Díaz-Pontones DM, Aguilar G. García-Lara S, Márquez J. (1998). *Phyton*. 63(1/2): 221-235
15. Díaz-Pontones DM, Pacheco G, Toledo C, González Soto. (2009). Ubicación y caracterización de la polifenol oxidasa durante la post germinación de semillas de *Ipomoea purpurea* (L) Roth. *Phyton* (en proceso de publicación).
16. Doares S. H. y col., (1995). *Plant Physiol*. 108:1741-1746
17. Durrant W.E. y Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42, 185-209.
18. Draper J. (1997). Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. *Trends Plant Sci*. 2, 162-165.
19. Espinosa, F. J. y J. Sarukhán. (1997). *Manual de malezas del valle de México: claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.*
20. Feys B., Benedetti C. Penfold C., Turner J. (1994). Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6:751-9
21. Frahry G, Schopfer P (2001) NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analysed with a tetrazolium-based assay. *Planta* 212: 175–183
22. Franke R, Schreiber L. (2007). Suberina biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol*. 10(3):252-9.
23. García M.R. Pérez L.R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. vol. 9: 5-10*
24. García-Ponce, B., and Rocha-Sosa, M. 2000. The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 157:181-190.

25. Guillot D. (2006). Acerca de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth e *Ipomoea nil* (L.) Roth en la comunidad valenciana. *Blancoana*. 20: 51-56.
26. Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer E, Wolfender JL. (2008). Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *arabidopsis* in response to wounding. *J Biol Chem*. [Enviado a impresión]
27. Greenberg J.T. y Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6 , 201-211.
28. Hachinohe M, Matsumoto H. (2007). Mechanism of selective phytotoxicity of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (l-dopa) in barnyardgrass and lettuce. *J Chem Ecol.* 33(10):1919-26.
29. Hagerman A. E., Butler L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J.Biol. Chem.*, 256 (9): 4494-4497.
30. Halliwell B. and Gutteridge J. M. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol. Asp. Med.* 8: 89-193
31. Hansberg T. W. (2002). Biología de las especies reactivas de oxígeno. *mensaje bioquímico.* 26:19-54.
32. Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
33. Held H. W. (1999). *Plant biochemistry and molecular biology.* Oxford University Press. Reino Unido. p.p. 375-393.
34. Igartuburu JM. (2000). Alelopatía en agroecosistema. Metodologías, aplicaciones y perspectivas. XII Seminario Científico y IV Simposio de Agricultura Sostenible. Resúmenes: 63. 2000
35. Jetter R., Wen M., Au J, Gniwotta F. (2006). Very-long-chain secondary alcohols and alkanediols in cuticular waxes of *pisum sativum* leaves. *Phytochemistry.* 67(22):2494-502
36. Johansen D. (1940). *Plant Microtechnique.* McGraw-Hill. Book Company. Inc.
37. José-Estanyol M y Puigdomenéch P. (2000). Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 97-100
38. Kim Y.C., Blee K.A., Robins J. y Anderson A.J. (2001). Oxycom™ under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. *Eur J Plant Pathol*, 107:129-136.
39. Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993), Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technol.* 47: 85-89.
40. Kuc'J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur J Plant Pathol*, 107:7-12.
41. Klessig D.F., Durner J., Noad R. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8849-8855
42. Lambeth J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4 , 181-189.
43. Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:405-30
44. Leon J., Lawton M.A. y Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108 , 1673-1678.
45. Lill G, Voit S, Schrör K , Weber AA. (2003). Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Letters*;546: 265-270.
46. Liskay A. Zalm E y Schopfer P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and •OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology* Vol. 136: 3114-3123
47. Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
48. Martínez J., González M., Culebras M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Coden Nuhoeq S.V.R.* p.p. 271-278.
49. Mayer A.M. (1987). Polyphenol oxidase and peroxidase in Plants-Recent Progress. *Phytochemistry.* 26:11-10.
50. Michaud D. Asselin A. (1995) *J Chromatography A.* 698: 263.
51. Miller P, Wilkin T.(2001). *Ipomoea* L. *System. Bot.* 26: 585-602

-
52. Minibayeva F, Mika A, Lüthje S. (2003). Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma*. May;221(1-2):67-72
 53. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. y Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9, 490-498
 54. Møller IM, Jensen PE, Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 58:459-81. Review.
 55. Mur L.A., Kenton P., Atzorn R. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol*. 140, 249-262
 56. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. y Rodwell, V. W., *Harper's Biochemistry*, Appleton & Lange, 1993. Información sobre la formación de los radicales libres dentro de las células y la acción protectora de antioxidantes endógenos y exógenos.
 57. O'Neill M.A y York W.S. (2003). The composition and structure of plant primary cell wall, In: The plant cell wall. *Annual Plant Reviews*. Vol 8. Ed. J. K. C. Rose. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 1-54.
 58. Ossowska M., S'Mialowska K., Kuter J., Wieron'ska B., Zieba J., Wardas P., Nowak J., Dabrowska A., Bortel I., Biedka G., Schulze H, y Rommelspacher. (2006). "Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: Implications for Parkinson's disease". *Neuroscience* 141 (4): 2155-2165.
 59. Peña Cortes (1993). *Planta*. 191:123-128.
 60. Pitzschke, A., and Hirt, H. 2006. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiology* 141:351-356.
 61. Poschenrieder, C. Tolrà R, Barceló J. (2006). "Interactions between metal ion toxicity and defences against biotic stress: glucosinolates and benzoxazinoids as case studies". *Forest, Snow And Landscape Research* 80 (2):149-160
 62. Price M. and Butler L. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric Determination of tannin content of sorghum Grain. *J Agric. Food Chem*. Vol 25. No. 6: 1268-1263.
 63. Price M. Van Scoyoc S. and Butler L. (1978). A Critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric. Food Chem*. Vol 26. No. 5: 1214-1218.
 64. Ranger CM, Singh AP, Frantz JM, Cañas L, Locke JC, Reding ME, Vorsa N.(2009). Influence of silicon on resistance of *Zinnia elegans* to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Environ Entomol*. Feb;38(1):129-36.
 65. Radman R., Saez T., Bucke C. y Keshavarz T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotech and Applied Biochem*, 37:91-102.
 66. Rawlins T. y Takahoshi. (1952). *Techniques of plant histochemistry and virology*. Malbrae C.A. National Press
 67. Reich E. Schibli A. Widmer V. Joms R. Wolfram E. DeBatt A. (2006). HPTLC Methods for identification of green tea and green tea extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 29:14. 2141-2151.
 68. Reich E, Schibli A, DeBatt A. (2008). Validation of high-performance thin-layer chromatographic methods for the identification of botanicals in a cGMP environment. *J AOAC Int*. Jan-Feb;91(1):13-20.
 69. Ritland K. Izoenzimes in Plant Genetics an Breeding. Part. A. Tanksley S. T. J. Orton eds. p.p. 289. Elsevier. Amsterdam.
 70. Ruuhola T, Salminen JP, Haviola S, Yang S, Rantala MJ. (2007). Immunological memory of mountain birches: effects of phenolics on performance of the autumnal moth depend on herbivory history of trees. *J Chem Ecol*. 33(6):1160-76
 71. Ruuhola T, Yang S. (2006). Wound-induced oxidative responses in mountain birch leaves. *Ann Bot*. Jan; 97(1):29-37.
 72. Rzedowski y Rzedowski (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.
 73. Sato y Hasegawa. (1976) *Phytochem* 15:1665.

74. Saxena I.M., Brown R.M. (2005). Celulose biosintesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot (Lond)* 96: 9-21.
75. Sagi M. y Fluhr R. (2001). Superoxide production by plant homologues of thegp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126, 1281-1290.
76. Songjie, Y.; Conglin, H.; Zhongyi, W.; Jianfang, H.; Tianzhong, L.; Shigui, L.; Wensuo, J. 2006. Stomatal movement in response to long distance-communicated signals initiated by heat shock in partial roots of *Commelina communis* L. *Science in China Series C: Life Sciences* 49, 18-25
77. Scalbert A. Monties B. and Janin G. (1989) Tannins in wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* Vol 37. No. 5: 1324-1329.
78. Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N. (2001). Analysis of condensed tannin: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91: 21-40.
79. Somerville C., Boue S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell wall. *Science* 306:2206-2211.
80. Suárez, G., Serrano, V., Pelz R., Balderas P. (2004). Atlas de malezas arvenses del estado de Querétaro, UAQ, 1ª edición, México
81. Sutherland MW, Learmonth BA (1997) The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radic Res* 27: 283-289
82. Swain T. Hills E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 63-68.
83. Taiz L. Zeiger E. (2006). "Secondary Metabolites and Plant Defense". *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
84. Tomas-Barberan, F. and Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agr*, 81, 853-876.
85. Thaler J. S. Fidantsef. R. M. Bostock. (2002). *J. Chem Ecol.* 28: 1131-1159.
86. Van Breusegem, F., and Dat, J.F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141:384-390.
87. Vallejos E. (1986). Izoenzymes in Plant Genetics and Breeding. Part. A. Tanksley S. T. J. Orton eds. p.p. 487, 491. Elsevier. Amsterdam.
88. Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
89. Vranová E., Inzé D., Van B. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
90. Wasternack, C., and Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2:302-307
91. Wink, M., and Schimmer, O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. pp. 17-134. In: M. Wink M. (ed.). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic 304 p.
92. Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M, (1997). *Chemistry and applications of green tea*. New York: CRC Press
93. Yun-Hee Kim, Soon Lim, Sim-Hee Han, Jae-Cheon Lee, Wan-Keun Song, Jae-Wook Bang, Suk-Yoon Kwon, Haeng-Soon Lee, Sang-Soo Kwak. (2007). Differential expression of 10 sweetpotato peroxidases in response to sulfur dioxide, ozone, and ultraviolet radiation. *Plant Physiology and Biochemistry* 45 : 908-914

La presente Tesis titulada "*Mecanismos de defensa de los cotiledones de la plántula de Ipomoea purpurea ante el daño mecánico: su relación entre especies reactivas de oxígeno, fenol oxidasas y fenol peroxidasas*", fue realizada por la B. E. Berenice Guadarrama Flores bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada y aceptada por los integrantes del Jurado de Examen de Grado designados por la División de Ciencias Biológicas de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa el 14 de diciembre de 2009.



Dr. Fernando Díaz de León Sánchez
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I
(Presidente)



Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Departamento de Bioquímica UNAM
(Secretario)



Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Departamento de Biología Comparada UNAM
(Vocal)



Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Departamento de Bioquímica UNAM
(Vocal)