



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EL ESTRÉS ALELOQUÍMICO:  
SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y  
ALGUNOS PROCESOS METABÓLICOS DE  
*Lycopersicon esculentum***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ALEJANDRA QUIJANO MATEOS**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

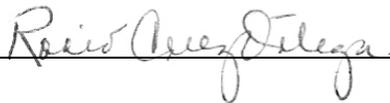
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**JURADO ASIGNADO:**

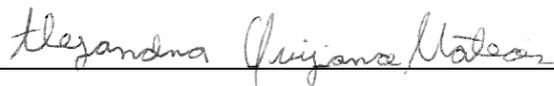
**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Carmen Giral Barnés**  
**VOCAL:**                           **Profesor: Homero Hernández Montes**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: María del Rocío Cruz Ortega**  
**1<sup>er</sup> SUPLENTE:**           **Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez**  
**2<sup>o</sup> SUPLENTE:**             **Profesor: Vanessa Maya Ampudia**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ALELOPATÍA, DEL DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA FUNCIONAL DEL INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. CIRCUITO EXTERIOR S/N. CIUDAD UNIVERSITARIA C.P. 04510**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**

  
\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: ALEJANDRA QUIJANO MATEOS**

  
\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por invitarme a trabajar en este proyecto. Por ayudarme a incursionar en el campo de la aleloquímica y a comprender lo necesario de un enfoque eco-fisiológico para el estudio de la materia viva. Por su dirección, confianza, paciencia, atenciones y amistad durante el tiempo que trabajamos juntas.

Al Dr. José Luis Mateos Gómez por todo el cariño, consejos y ayuda que me ha brindado a lo largo de esta carrera, especialmente por el apoyo para la impresión de esta tesis. Gracias por siempre recibirme, por potenciar y compartir ese amor a la universidad, a la facultad y a la química y por darle un toque más familiar.

Al Dr. José Humberto Mateos Gómez por siempre inspirarme a crecer académicamente y a querer ser más que una mujer de ciencia: ser una persona universal. Gracias por todo tu cariño, tu apoyo y por el placer que era platicar contigo.

A mis abuelas Lorna y Yolanda por el amor, la compañía y la ayuda que siempre me han brindado.

A mis padres: Alejandro Quijano Pantoja y Ana María Mateos Wilson que siempre han asegurado que no me falte nada, que me han consentido y guiado para siempre ser mejor y esperar más de mí. Gracias por todos sus esfuerzos y amor.

A mis tíos, tías y primos por todo su apoyo, cariño y atenciones. Por mantener siempre junta a la familia y por el gusto de vernos.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo del económico del proyecto IN205705 de PAPIIT.

## DEDICATORIA

A mi hermano David Nazul Quijano Mateos que siempre ha sido mi compañero incondicional, por todo su cariño y tiempo.

A todo el personal del laboratorio de Alelopatía por el apoyo y por la maravilla que es trabajar en ese ambiente. Gracias especialmente a Teresita.

A mis mejores amigas: María Peñafiel García por su talento para las actividades simples, repetitivas y enajenantes. A Melissa Wilson Becerril por su peculiar sentido del humor y su singular risa. Gracias a las dos por todo su amor, por lo que hemos vivido y lo que nos falta.

A Patricia García Santaella, mi segunda madre, por sus sabios consejos y por mantener siempre junta a la familia extendida.

A María Elena Bravo y Perla Castañeda por su amistad, por el placer que es trabajar para y con ellas, por todo su apoyo y su cariño.

A mis amigos de la facultad por compartir conmigo 5 años de alegría, trabajo, estrés, estudio, compañerismo y el particular estilo de vida que implica ser químico.

A mis amigos de la prepa, los compartidos, los consecuentes, los agregados, los antiguos y los más recientes.

## ÍNDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN.....  | 1  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 2  |
| 1.1. Germinación.....   | 2  |
| 1.2. Alelopatía.....  | 5  |
| 1.3. Estrés aleloquímico, <i>Sicyos deppei</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i> .....   | 8  |
| 1.4. Proteasas de serina y sus inhibidores.....   | 9  |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....   | 12 |
| 2.1. Hipótesis.....   | 12 |
| 2.2. Objetivo general.....  | 12 |
| 2.3. Objetivos particulares.....  | 12 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 14 |
| 3.1. Material vegetal.....  | 14 |
| 3.2. Purificación parcial de proteínas de bajo peso molecular.....  | 14 |
| 3.3. Curvas dosis-respuesta de germinación y de elongación<br>radicular de <i>L. esculentum</i> .....   | 16 |
| 3.4. Bioensayos.....  | 18 |
| 3.5. Determinación de actividades enzimáticas.....  | 19 |
| 3.5.1. Enzimas del metabolismo central de carbono: 6 –<br>fosfofructocinasa, fructosa – 1,6 – bifosfatasa, malato<br>deshidrogenasa e isocitrato liasa..... | 19 |
| 3.5.2. Enzimas del sistema antioxidante: catalasa y superóxido<br>dismutasa.....  | 20 |
| 3.5.3. Enzima de degradación de carbohidrato de la pared celular:<br>$\beta$ – 1,3 – glucanasa.....   | 21 |
| 3.5.4. Procesamiento de datos.....  | 22 |
| 3.6. Determinación de la permanencia del efecto alelopático de <i>S.</i><br><i>deppei</i> en el suelo.....  | 22 |
| 3.7. Equipos, reactivos y programas empleados.....  | 24 |
| 4. RESULTADOS.....  | 26 |
| 4.1. Purificación parcial de proteínas de bajo peso molecular.....  | 26 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 4.2. | Curvas dosis-respuesta de germinación y de elongación radicular de <i>L. esculentum</i> .....  | 27 |
| 4.3. | Enzimas del metabolismo central de carbono: 6 – fosfofructocinasa, fructosa – 1,6 – bifosfatasa, malato deshidrogenasa e isocitrato liasa..... | 30 |
| 4.4. | Enzimas del sistema antioxidante: catalasa y superóxido dismutasa.....   | 35 |
| 4.5. | Enzima de degradación de carbohidratos de la pared celular: $\beta$ – 1,3 – glucanasa.....   | 38 |
| 4.6. | Permanencia del efecto alelopático de <i>S. deppei</i> en el suelo....   | 40 |
| 5.   | DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....   | 43 |
| 5.1. | Presencia de proteínas de bajo peso molecular.....   | 43 |
| 5.2. | Retraso en la germinación e inhibición de la elongación radicular de <i>L. esculentum</i> .....  | 44 |
| 5.3. | Enzimas del metabolismo central de carbono.....  | 45 |
| 5.4. | Enzimas del sistema antioxidante.....  | 48 |
| 5.5. | Enzima de degradación de carbohidratos de la pared celular.....  | 49 |
| 5.6. | Permanencia del efecto alelopático de <i>S. deppei</i> en el suelo....   | 50 |
| 6.   | CONCLUSIONES.....  | 51 |
| 7.   | BIBLIOGRAFÍA.....  | 52 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Principales eventos asociados durante la germinación.....  | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Estructura de la semilla de <i>Capsicum annum</i> .....  | 3  |
| <b>Figura 3.</b> Movilización de proteínas y triacilgliceroles (TAGS) de reserva en cotiledones.....  | 4  |
| <b>Figura 4.</b> Mecanismos de liberación de aleloquímicos al medio.....  | 6  |
| <b>Figura 5.</b> Posibles efectos fisiológicos de un aleloquímico.....  | 7  |
| <b>Figura 6.</b> Mecanismo de reacciones catalizadas por proteasas de serina.....   | 10 |
| <b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo para el proceso de purificación parcial de proteínas de bajo peso molecular a partir de un lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> concentrado.....                     | 15 |
| <b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo para el experimento de determinación de permanencia del efecto alelopático de <i>S. deppei</i> en el suelo.....  | 23 |
| <b>Figura 9.</b> SDS- PAGE del proceso de purificación parcial de proteínas de bajo peso molecular a partir de un lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> (20% m/v) teñido con SPYRO® rubí.....            | 26 |
| <b>Figura 10.</b> Porcentaje de germinación de semillas de <i>L. esculentum</i> a las 48 y 72 horas de imbibición con diferentes concentraciones de lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> (S) y FSP..... | 28 |
| <b>Figura 11.</b> Curvas dosis-respuesta gradual de lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> , FSP y PMSF sobre la elongación radicular de <i>L. esculentum</i> .....                                       | 29 |
| <b>Figura 12.</b> Actividad de la PFK.....  | 30 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 13.</b> Actividad de la FBPasa.....   | 32 |
| <b>Figura 14.</b> Actividad de la MDH.....  | 33 |
| <b>Figura 15.</b> Actividad de la ICL.....  | 34 |
| <b>Figura 16.</b> Actividad de la CAT.....  | 36 |
| <b>Figura 17.</b> Actividad de la SOD.....  | 37 |
| <b>Figura 18.</b> Actividad de la $\beta - 1,3 -$ glucanasa.....  | 39 |
| <b>Figura 19.</b> Porcentaje de germinación de semillas de <i>L. esculentum</i><br>embebidas en diferentes lixiviados de suelo..... | 40 |
| <b>Figura 20.</b> Elongación radicular de semillas de <i>L. esculentum</i> embebidas en<br>diferentes lixiviados de suelo.....      | 41 |
| <b>Figura 21.</b> Esquema de las vías metabólicas estudiadas.....   | 46 |

## ABREVIATURAS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ABA                             | Ácido abscísico                                    |
| ATP                             | Trifosfato de Adenosina                            |
| BM                              | Baño María   |
| BICINE                          | <i>N,N</i> -Bis(2-hidroxietil)glicina              |
| CAT                             | Catalasa   |
| CI <sub>70</sub>                | Concentración inhibitoria del 70%                  |
| CO <sub>2</sub>                 | Dióxido de carbono                                 |
| DNA                             | Ácido desoxirribonucleico                          |
| DTT                             | Ditiotreitol                                       |
| EDTA                            | Ácido etilendiaminotetraacético                    |
| ERO                             | Especies Reactivas de Oxígeno                      |
| FBPasa                          | Fructosa – 1,6 – bifosfatasa                       |
| FSP                             | Fracción Semipurificada                            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | Peróxido de oxígeno                                |
| HCl                             | Ácido Clorhídrico                                  |
| HEPES                           | Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanesulfónico |
| ICL                             | Isocitrato liasa                                   |
| MDH                             | Malato deshidrogenasa                              |
| MgCl <sub>2</sub>               | Cloruro de magnesio                                |
| MOPS                            | Ácido 4-Morfolinepropanesulfónico                  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Carbonato de sodio                                 |
| NADP                            | Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato          |
| NAOH                            | Hidróxido de sodio                                 |

|            |   |
|------------|---|
| $O_2^-$    | Anión superóxido  |
| PFK        | 6 – fosfofructocinasa   |
| PMSF       | Fluoruro de fenilmetilosulfonio                                   |
| PVP        | Polivinilpirrolidona  |
| RNA        | Ácido ribonucleico  |
| SDS        | Dodecilsulfato sódico   |
| SDS-PAGE   | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SOD        | Superóxido dismutasa  |
| TAGS       | Triacilgliceroles   |
| TCA        | Ciclo tricarbónico  |
| TEMED      | N,N,N,N'-tetrametilnediamina                                      |
| Tris       | 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol                          |
| $\epsilon$ | Coeficiente de extinción molar                                    |

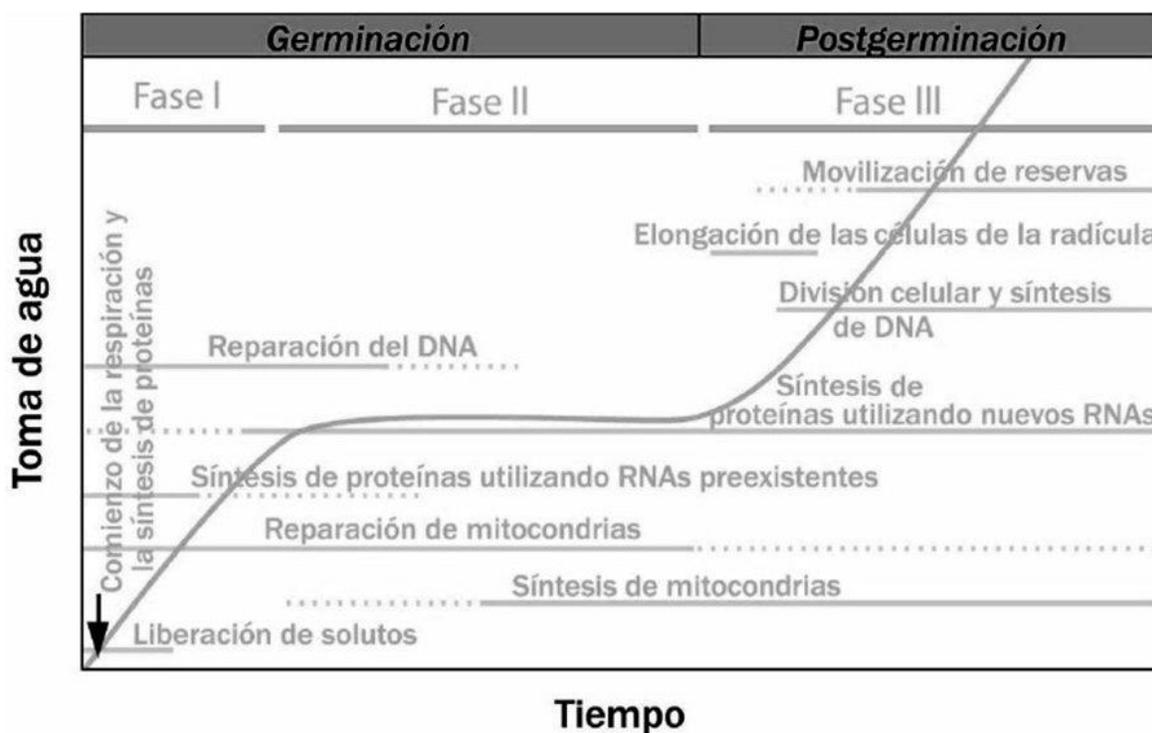
## RESUMEN

*Sicyos deppei* G. Don (Cucurbitaceae), localmente conocida como *chayotillo*, es una maleza endémica de México y es considerada como una planta perjudicial en los campos de cultivo por su fuerte potencial alelopático. Se han realizado diversos estudios sobre los mecanismos fitotóxicos del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre la germinación del jitomate (*Lycopersicon esculentum*); sin embargo, los aleloquímicos implicados en el estrés estudiado no se habían identificado. A partir de la información disponible sobre la presencia de inhibidores de proteasas de serina en miembros de la familia *Cucurbitaceae*, se exploró la posibilidad de la presencia de proteínas de bajo peso molecular (entre ellas, probablemente un inhibidor de proteasas de serina) en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y que éstas fueran responsables de los efectos fitotóxicos que se han estado estudiando. En el presente trabajo se confirmó la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, y se compararon los efectos de una fracción semipurificada (FSP) del mismo con los del lixiviado completo sobre la germinación, la elongación radicular, la actividad de enzimas representativas del metabolismo central del carbono, del sistema antioxidante y de la degradación de carbohidratos del endospermo micropilar en *L. esculentum*. Por medio de curvas de dosis-respuesta, se encontró que la FSP (0.096 µg/µL) retrasa la germinación e inhibe la elongación radicular de *L. esculentum*; las curvas obtenidas sugieren que la FSP y el lixiviado acuoso de *S. deppei* son equivalentes fitotóxicos. En los ensayos de actividad enzimática se encontró que los efectos de ambos tratamientos presentan tendencias similares, lo cual sugiere que el estrés aleloquímico del lixiviado acuoso de *S. deppei* se debe a la presencia de dichas proteínas. Finalmente, se comprobó la permanencia del efecto fitotóxico de *S. deppei* en el suelo.

# 1. INTRODUCCIÓN

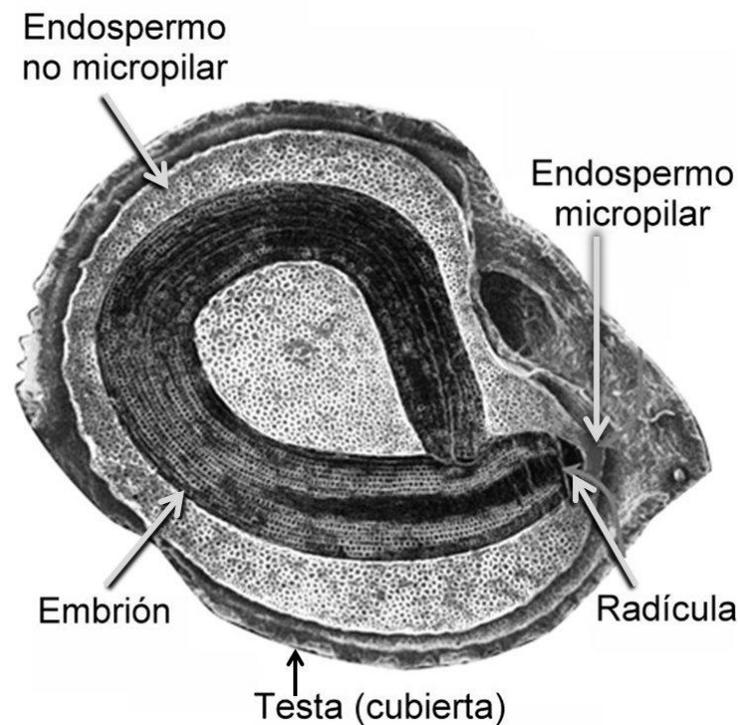
## 1.1. Germinación

La germinación inicia con la imbibición de la semilla (el proceso de absorción de agua) y concluye con la emergencia de la radícula. La germinación se divide en tres fases, de acuerdo con la hidratación que ocurre durante la imbibición. Como se observa en la figura 1, al inicio hay una toma de agua rápida (Fase I), posteriormente hay un periodo estacionario (Fase II) y finalmente empieza la reactivación metabólica de la semilla y la toma de agua se asocia con un aumento en la respiración y producción de ATP (Fase III o postgerminación). La duración de estas fases depende de ciertas propiedades inherentes de la semilla y de las condiciones de la hidratación (Bewley, 1997).



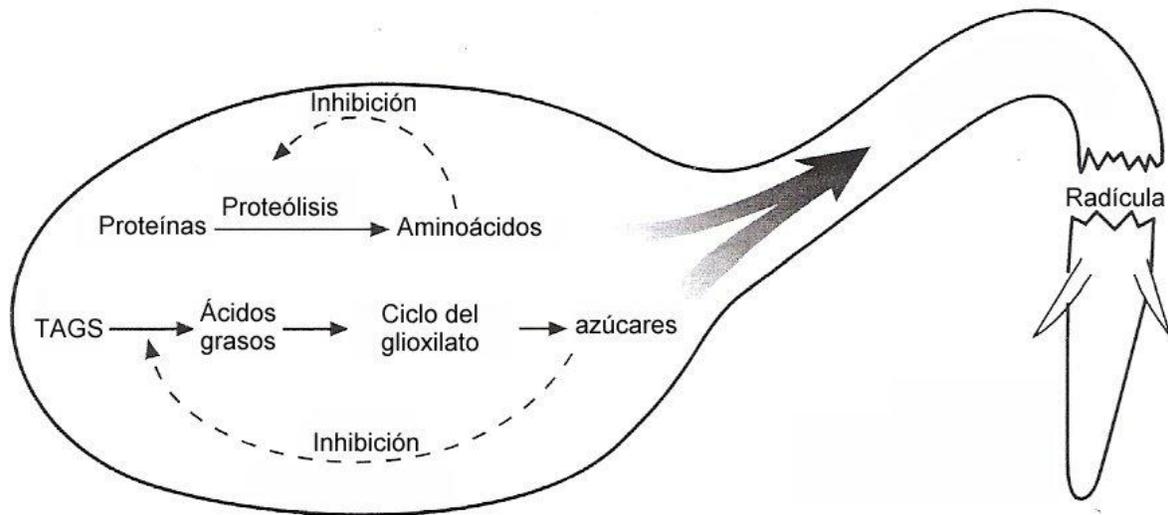
**Figura 1.** Principales eventos asociados durante la germinación (tomada y modificada de Bewley, 1997).

Según Bewley (1997), en semillas secas, la respiración y el metabolismo son extremadamente lentos, las membranas y varios organelos celulares no están completamente definidos y son bioquímicamente disfuncionales. La presencia de membranas no estructuradas implica que su permeabilidad sea ineficaz, por lo que se puede presentar liberación de solutos al inicio de la imbibición. Algunos compuestos que se liberan durante la imbibición pueden ser inhibidores de la germinación, como el ácido abscísico (ABA) y algunos ácidos fenólicos. Durante las primeras horas de la imbibición, las membranas son restauradas, al igual que los organelos. Con la hidratación hay un aumento en la respiración y en el consumo de oxígeno, lo cual implica la reactivación de las enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales, así como la biogénesis mitocondrial y una activa síntesis de proteínas. La elongación de la radícula y su emergencia de la testa completan la fase II de la germinación. La protrusión y elongación radicular se lleva a cabo por la combinación del debilitamiento de la pared celular del endospermo micropilar, de la testa y la presión ejercida por los constituyentes celulares de la radícula (Bewley, 1997).



**Figura 2.** Estructura de la semilla de *Capsicum annum* (tomada y modificada de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Las reservas de las semillas consisten de proteínas, lípidos y almidón. Durante la postgerminación la movilización de las reservas de los órganos de almacenamiento, o bien, del endospermo proporciona la energía para el crecimiento y la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1994).



**Figura 3.** Movilización de proteínas y triacilglicerol (TAGS) de reserva en cotiledones (tomada y modificada de Bewley y Black, 1994).

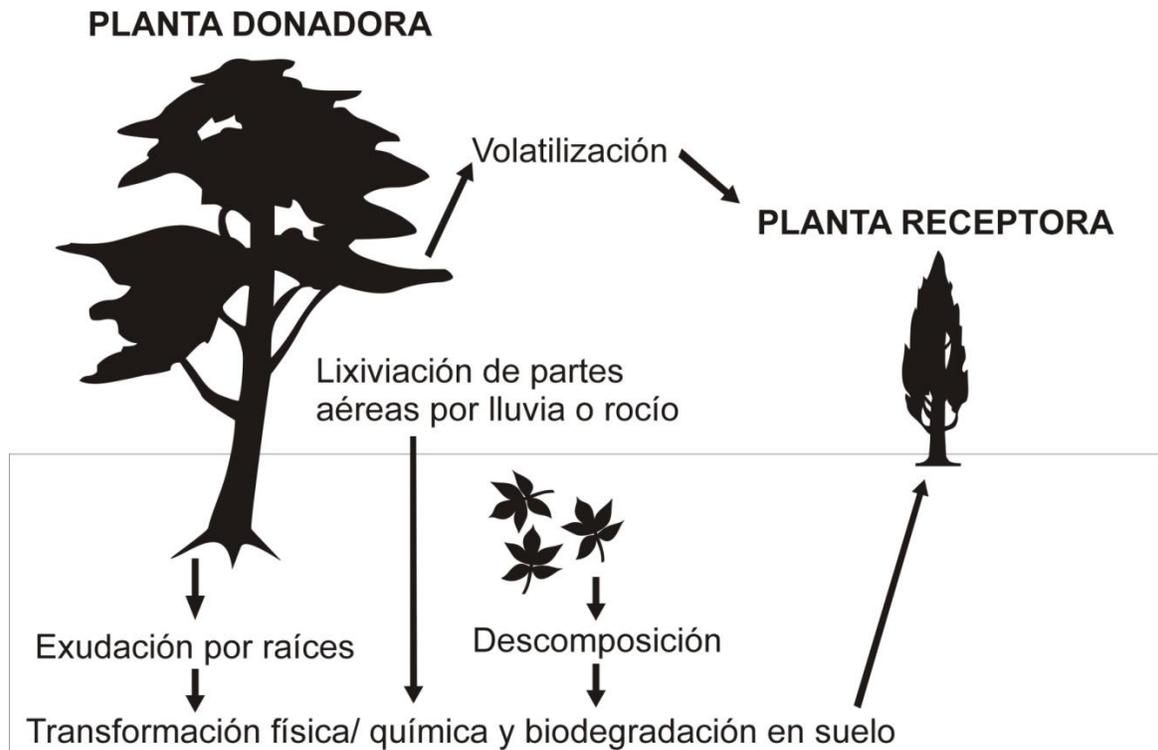
El proceso de germinación puede ser afectado por diferentes factores, entre ellos destaca el estrés biológico. De acuerdo con Larcher (1995), el estrés biológico es cualquier factor biótico o abiótico que puede alterar un proceso fisiológico en el organismo afectado. Los factores abióticos que pueden ocasionar estrés en plantas son la temperatura, la humedad, la radiación, el viento, la concentración de sales en el suelo, la deficiencia o exceso de nutrimentos y el pH, entre otros. Los factores bióticos que pueden ocasionar estrés en plantas son la sobrepoblación, la competencia, los patógenos (insectos, microorganismos y parásitos), los herbívoros y las interacciones químicas (alelopatía).

## 1.2. Alelopatía

La alelopatía es una ciencia que forma parte de la ecología química y se refiere a las interacciones químicas entre plantas y otros organismos en ecosistemas naturales y agrícolas (Dakshini et al. 1999). Estas interacciones son mediadas a través de metabolitos secundarios producidos y liberados al medio por plantas y/o microorganismos ‘donadores’ los cuales pueden influir sobre el metabolismo y desarrollo de otros organismos ‘receptores’. Si el efecto de estos metabolitos secundarios o *aleloquímicos* es perjudicial, se convierte en un estrés biótico que se conoce como estrés aleloquímico, y que influye directa o indirectamente sobre otras plantas y organismos receptores (Hale y Orcutt 1987; Anaya 1999; Reigosa et al. 2002; Romero-Romero et al. 2005; Lara-Núñez et al. 2006).

De acuerdo con Tukey (1969), la liberación de los aleloquímicos al ambiente ocurre por:

- Volatilización a través de las hojas.
- Lixiviación o lavado de las partes aéreas de la planta, por la lluvia, la niebla y el rocío.
- Exudación a través de las raíces.
- Liberación de los compuestos de los restos orgánicos por medios de lixiviación o por la descomposición microbiana de los mismos.

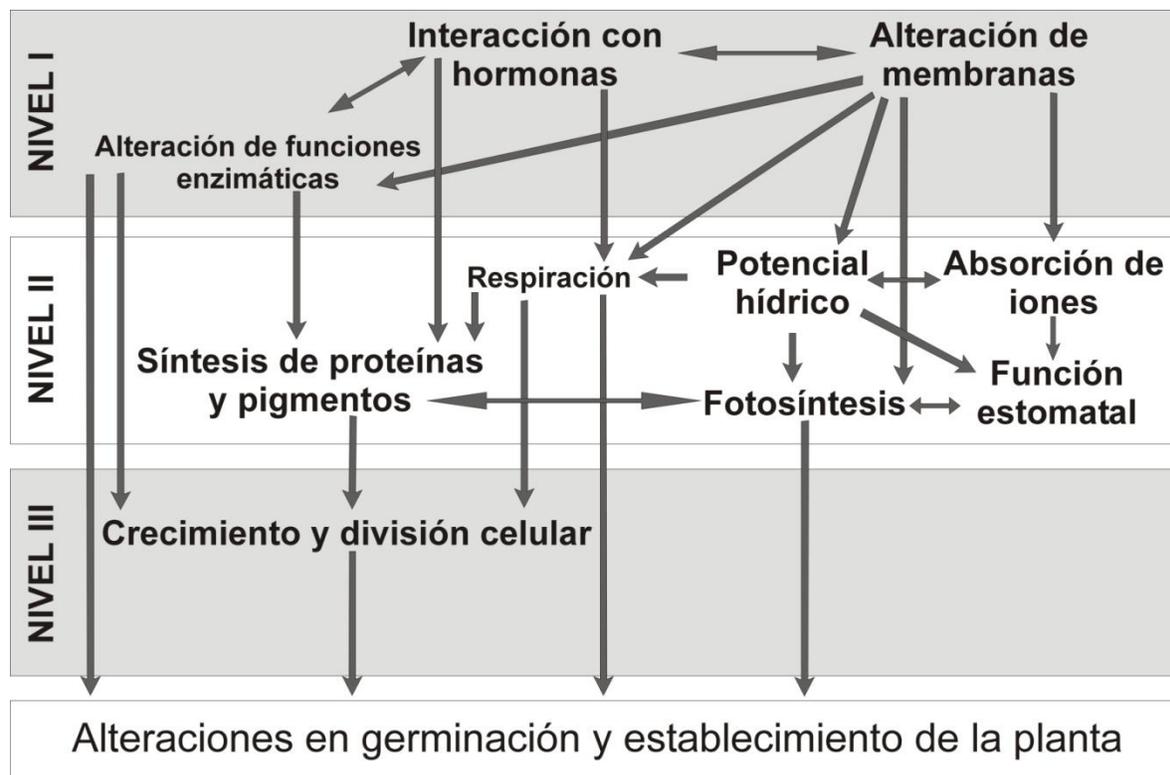


**Figura 4.** Mecanismos de liberación de aleloquímicos al medio (tomada y modificada de Reigosa et al. 1999).

Una vez liberados al suelo, los compuestos alelopáticos de la planta donadora, pueden ejercer su efecto perjudicial o fitotóxico de forma directa al ser absorbidos por la planta receptora afectando su germinación, o bien, su establecimiento y desarrollo como planta. Estos compuestos pueden afectar directamente los procesos celulares primarios de las plantas receptoras. El efecto de estos compuestos depende de su naturaleza química, de su concentración, de la sensibilidad de la planta receptora, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales (Putnam y Tang, 1986).

La naturaleza química de los compuestos alelopáticos es tan diversa como sus sitios y mecanismos de acción biológica sobre el organismo receptor (Einhellig 2002; Weir et al. 2004). Algunos de los procesos celulares que pueden ser afectados por los aleloquímicos se muestran en la figura 5 y son: 1) el crecimiento y la división celular, por ejemplo afectando la mitosis; 2) la interacción con

fitohormonas, los aleloquímicos pueden interactuar con los reguladores del crecimiento y del metabolismo de las plantas; 3) la función enzimática; pueden modificar directamente la síntesis y la actividad de varias enzimas y 4) la permeabilidad de la membrana; los aleloquímicos pueden producir alteraciones sobre la integridad estructural y funcional de la membrana, lo cual lleva a perturbaciones sobre la absorción, respiración y fotosíntesis.



**Figura 5.** Posibles efectos fisiológicos de un aleloquímico (tomada y modificada de Reigosa et al. 1999).

Las relaciones aleloquímicas entre plantas, como parte del proceso de interferencia, están reconocidas como un factor clave en los patrones de vegetación y en el crecimiento de malezas y productividad de cultivos en los sistemas agrícolas (Foy e Inderjit , 2001). Debido a esto, el estudio de la alelopatía ha recibido considerable atención tanto porque la liberación de compuestos perjudiciales puede disminuir la productividad (Waller 1987), como porque

representan una fuente química para el desarrollo de plaguicidas naturales (Einhellig 1985; Duke y Lyndon 1988).

El conocimiento de la estructura química de los aleloquímicos, de sus efectos específicos en el metabolismo del organismo receptor, así como su permanencia activa en el suelo, contribuye al conocimiento de su significancia ecológica. Debido a la complejidad de las condiciones espacio-temporales de las relaciones entre los organismos en el ambiente, el estudio de la alelopatía se enfrenta a una gran diversidad de procesos actuando al mismo tiempo y a diferentes niveles de organización biológica.

### **1.3. Estrés aleloquímico, *Sicyos deppei* y *Lycopersicon esculentum***

*Sicyos deppei* G. Don (Cucurbitaceae) es localmente conocida como *chayotillo*; es una planta endémica de la parte central de México (Lira et al. 1998; Lira et al. 2002), crece rápida y extensamente; este tipo de crecimiento le permite invadir el suelo rápidamente y eliminar otras plantas casi por completo. *S. deppei* es considerada como una maleza perjudicial en los campos de cultivo, disminuyendo su productividad (Villaseñor y Espinosa 1998). En el laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, se han realizado estudios sobre el efecto alelopático de *S. deppei* y sus modos de acción. En estos estudios se ha reportado su fuerte potencial alelopático: el lixiviado acuoso de *S. deppei* inhibe el crecimiento radicular de varias especies como *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), *Pennisetum purpureum* (pasto elefante), *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Curcubita pepo* (calabaza), *Curcubita ficifolia* (chilacayote) y *Lycopersicon esculentum* (jitomate) (Hernández-Bautista et al. 1996).

En estos estudios se observó que la planta más sensible al estrés aleloquímico causado por *S. deppei* es *L. esculentum*, por lo que se ha estado utilizando como modelo de planta receptora en estudios posteriores, realizados con el objetivo de explicar los mecanismos de acción, o las respuestas fisiológicas, que están

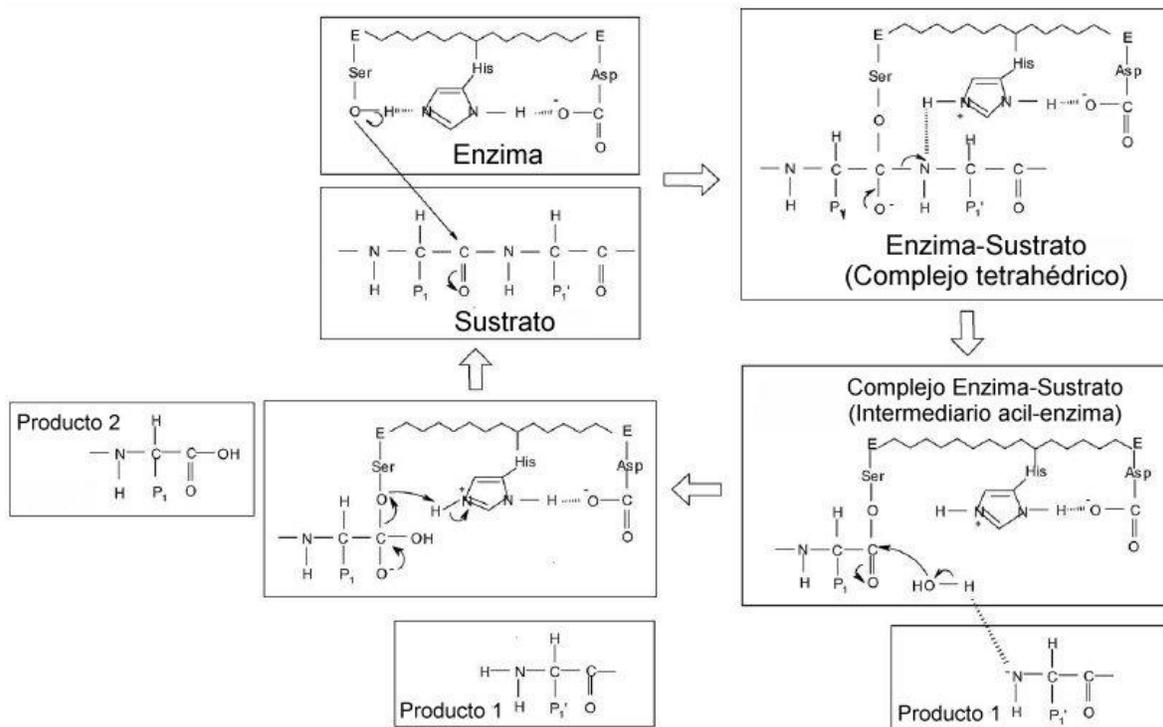
involucradas en el efecto fitotóxico de *S. deppei* durante la germinación y el crecimiento de *L. esculentum*.

En dichos estudios, se ha reportado que las respuestas de *L. esculentum* al estrés aleloquímico causado por *S. deppei* son similares a las producidas por un estrés hídrico. En radículas después de 72 horas de exposición al lixiviado acuoso de *S. deppei* se ha observado una plasmólisis en células de la periferia, una inhibición de la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática y del tonoplasto, además genera un daño oxidativo, determinado por un aumento en los niveles de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ERO), en la actividad de la catalasa, y en una peroxidación de lípidos de membrana (Romero-Romero, 2004; Romero-Romero et al. 2005). Posteriormente, se confirmó que a 12, 24, 48 y 72 horas de imbibición, *S. deppei* causa un desbalance en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante como la catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa, generando un aumento en los niveles de  $H_2O_2$  y del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), así como una inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa de membrana (Lara-Núñez et al. 2006). Asimismo, se realizaron otros estudios considerando diferentes tiempos de germinación y postgerminación (0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas), los cuales se enfocaron en la movilización de las reservas, la actividad y expresión de enzimas encargadas del debilitamiento de la pared celular del endospermo y el contenido de ABA. Dichos estudios mostraron: 1) un retraso en la hidrólisis del almidón y alteración en los niveles de sacarosa, fructosa y glucosa, 2) disminución de las actividades de las enzimas relacionadas con esta movilización: sucrosa fosfato sintetasa, invertasa de pared celular y  $\alpha$ -amilasa, 3) disminución en las actividades de las enzimas involucradas en el ablandamiento del endospermo micropilar: endo -  $\beta$  - mananasa,  $\beta$  - 1,3 - glucanasa,  $\alpha$  - galactosidasa y exo - poligalacturonasa y 4) un mayor contenido de ABA (Romero-Romero et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2006). Los estudios sobre el efecto fitotóxico del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre la germinación y establecimiento de *L. esculentum* continúan, la línea de

investigación en los últimos dos años se ha enfocado en el metabolismo central del carbono.

#### 1.4. Proteasas de serina y sus inhibidores

Las proteasas de serina (EC 3.4.21) tienen un residuo Ser en su sitio activo. Estas enzimas forman complejos covalentes enzima-sustrato y llevan a cabo un ataque nucleofílico en el grupo carbonilo del enlace peptídico.



**Figura 6.** Mecanismo de reacciones catalizadas por proteasas de serina (tomada y modificada de Antão y Malacata, 2005).

Las proteasas de serina se han aislado de varias especies de plantas, en diferentes estructuras, desde la semilla hasta resinas y frutos. En los últimos 5 años, se ha estudiado el papel de las proteasas de serina, principalmente las subtilasas, en varios procesos fisiológicos de las plantas. Se han relacionado con la microsporogénesis, simbiosis, respuestas de hipersensibilidad, transducción de señales y diferenciación, senescencia y degradación de proteínas durante la

movilización de reservas, aunque el papel de la gran mayoría de estas enzimas no se ha establecido (Antão y Malcata, 2005).

Los inhibidores de proteasas de serina en plantas se dividen en varias familias: Kunitz, Bowman-Birk, de la papa I y II, de la calabaza, entre otros (Otlewski, 1993). Los inhibidores de tripsina de la calabaza son los inhibidores de proteasas de serina más pequeños. Se han aislado a partir de numerosos miembros de la familia *Curcubitaceae*, generalmente tienen un peso molecular bajo (rango aproximado de 3 kDa), tienen alrededor de 27 a 34 aminoácidos entrecruzados con 3 puentes disulfuro, algunos tienen estructura cíclica y sus altas constantes de asociación los caracteriza como fuertes inhibidores de proteasas (Wieczorek et al. 1985; Krishnamoorthi et al. 1990; Hider et al. 1987). Algunos autores han planteado que los inhibidores de proteasas de serina en plantas están involucradas en la eliminación de enzimas proteolíticas secretadas por microorganismos fitopatogénicos (Dunaevsky et al. 2005), sin embargo, los blancos endógenos de estos inhibidores se desconocen y tampoco existe información sobre el efecto que pueden tener estos inhibidores, como aleloquímicos en plantas receptoras.

Como se mencionó anteriormente, se han estudiado varios aspectos fisiológicos y metabólicos en la respuesta de *L. esculentum* ante el estrés aleloquímico producido por *S. deppei* (Cucurbitaceae), sin embargo, los compuestos alelopáticos responsables de este efecto no se han identificado. Dada la información preliminar, es posible que el compuesto aleloquímico responsable del efecto fitotóxico del lixiviado acuoso de *S. deppei* sea una proteína de bajo peso molecular; por ejemplo, un inhibidor de proteasas de serina.

Para este trabajo, con base en los antecedentes anteriormente mencionados, se proponen la siguiente hipótesis y objetivos:

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

Si el efecto alelopático del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre *L. esculentum* se debiera a la presencia de proteínas de bajo peso molecular, entonces, los efectos fisiológicos y metabólicos del lixiviado acuoso de *S. deppei* y los de estas proteínas sobre *L. esculentum* serían similares.

### **2.2. Objetivo general**

Comparar los efectos fitotóxicos del lixiviado acuoso de *S. deppei* con los de una fracción semipurificada de proteínas de bajo peso molecular presentes en el mismo, sobre la germinación y algunos procesos metabólicos de *L. esculentum*.

### **2.3. Objetivos particulares**

- Realizar una purificación parcial de proteínas de bajo peso molecular a partir del lixiviado acuoso de *S. deppei*.
- Comparar el efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* con el de las proteínas semi-purificadas sobre:
  - La germinación y elongación radicular de *L. esculentum* mediante curvas dosis-respuesta.
  - La actividad de enzimas representativas del metabolismo central de carbono durante la germinación de *L. esculentum*:
    - Glucólisis: 6 – fosfofructocinasa
    - Gluconeogénesis: fructosa – 1,6 – bifosfatasa
    - Ciclo de Krebs: malato deshidrogenasa

- Ciclo del glioxilato: isocitrato liasa
  - La actividad de enzimas representativas del sistema antioxidante durante la germinación de *L. esculentum*:
    - Catalasa
    - Superóxido dismutasa
  - La actividad de una enzima de degradación de carbohidratos de la pared celular del endospermo durante la germinación de *L. esculentum*:
    - $\beta$  – 1,3 – glucanasa
- Comprobar la permanencia del efecto fitotóxico del lixiviado acuoso de *S. deppei* en el suelo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

**Planta receptora:** semillas de jitomate *Lycopersicon esculentum* Mill (Solanaceae). Var. Río Grande obtenidas de la compañía Sun Seeds, Parma, CA, USA. Las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos, posteriormente se enjuagaron exhaustivamente con agua doblemente destilada hasta eliminar residuos de cloro y se dejaron secar al aire.

**Planta alelopática:** plantas de *Sicyos deppei*, G. Don. (Cucurbitaceae) (chayotillo) se colectaron en la zona del Pedregal. Las plantas se secaron al aire (27-30°C).

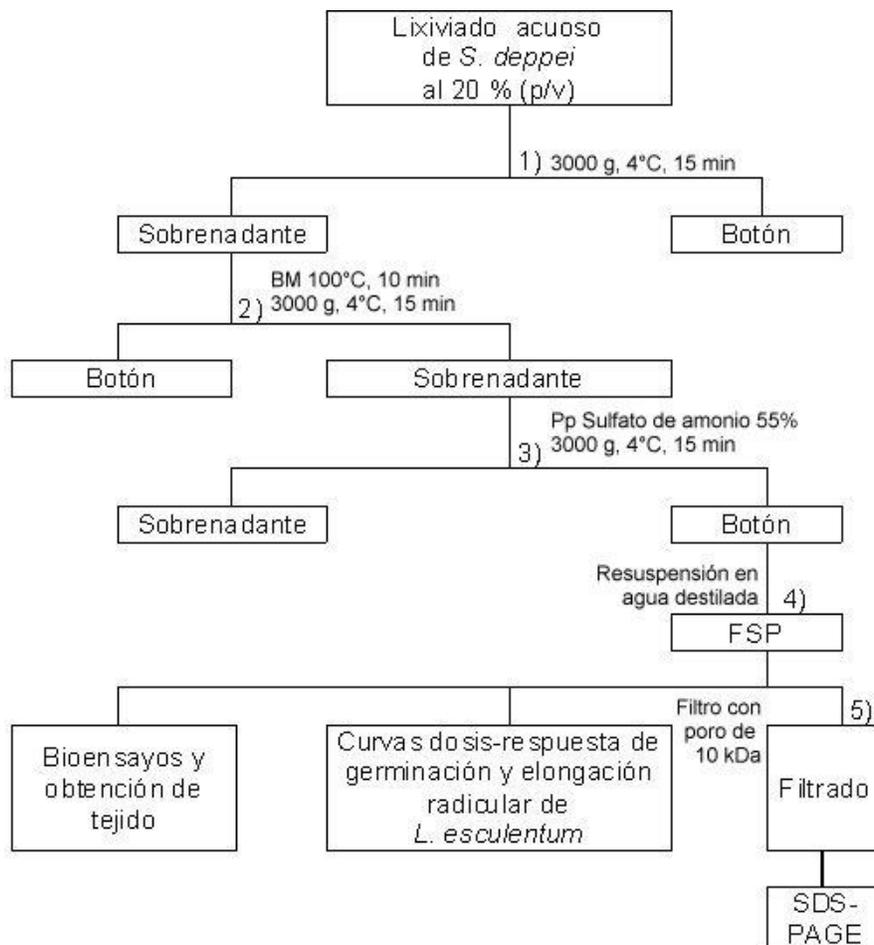
#### 3.2. Purificación parcial de proteínas de bajos peso molecular

Estudios anteriores realizados en el laboratorio de Alelopatía (Romero-Romero, 2004; Romero-Romero et al. 2005), mostraron que el lixiviado acuoso de *S. deppei* al 0.5% retrasa la germinación de semillas de *L. esculentum* e inhibe la elongación radicular hasta un 70%, sin embargo, los metabolitos secundarios involucrados en este efecto fitotóxico no se habían identificado. Se han aislado varios inhibidores de proteasas de serina de numerosos miembros de la familia *Cucurbitaceae* pero su efecto sobre otras plantas no se ha establecido. A fin de relacionar el efecto fitotóxico de *S. deppei* sobre *L. esculentum* con la presencia de proteínas de bajo peso molecular (posiblemente entre ellas un inhibidor de proteasas de serina), se realizó una purificación parcial de dichas proteínas a partir de un lixiviado acuoso concentrado de *S. deppei*.

**Procedimiento de purificación:** se lixivió la parte aérea seca de *Sicyos deppei* (hojas y tallos) (20% m/v) en agua doblemente destilada estéril durante 24 horas. El lixiviado se filtró a través de un filtro Whatman No. 4 y se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó en un baño maría a 90°C

durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta una saturación del 55% de acuerdo con la técnica descrita por Scopes (1982), se produjo una precipitación y se volvió a centrifugar a 3000 g durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el botón resultante se resuspendió en agua destilada; esta suspensión se denominó “fracción semipurificada” (FSP). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

En otra purificación el botón se resuspendió en Tris-HCl pH 8.0, se colocó en un tubo Amicon 10 kDa y se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos a 4°C. Esta última fracción se utilizó para su separación en electroforesis. La figura 7 muestra el diagrama de flujo del proceso realizado.



**Figura 7.** Diagrama de flujo para el proceso de purificación de proteínas de bajo peso molecular a partir de un lixiviado acuoso de *S. deypei* concentrado.

**Electroforesis SDS-PAGE con tricina:** se realizó la electroforesis de acuerdo con el protocolo propuesto por Schägger (2006). El gel concentrador consistió de acrilamida-bisacrilamida 4%, Tris 0.25 M, HCl 0.08 M, SDS 0.008%, pH final de 8.45, persulfato de amonio 0.075% y TEMED 0.75%. El gel separador consistió de acrilamida-bisacrilamida 20%, Tris 0.33 M, HCl 0.11 M, SDS 0.03%, Urea 6M, pH final de 8.45, persulfato de amonio 0.03% y TEMED 0.03%. Las muestras consistieron de 25 µg de proteína en amortiguador de carga 1:4 (SDS 12%, 2-mercaptoetanol 6%, azul de Coomassie G-250 0.05%, Tris-HCl 150 mM pH 7.0). El amortiguador del ánodo fue de Tris-HCl 0.1M a pH 8.9 y el amortiguador del cátodo consistió en Tris 0.1M, tricina 0.1M y SDS 0.1% a pH final 8.25. El gel con las muestras (pozo con 5µg proteína / mL) se corrió en una cámara de electroforesis Bio-Rad a voltaje constante de 90 V durante 4 horas.

**Visualización de los geles:** el gel se tiñó con rubí SPYRO® y se visualizó con el sistema Gel Logic 100 Image (Kodak).

### **3.3. Curvas dosis-respuesta de germinación y elongación radicular de *L. esculentum***

Con el fin de comparar el efecto fitotóxico del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre *L. esculentum* con el efecto de la FSP, se realizaron curvas dosis-respuesta para evaluar la germinación y la elongación radicular de *L. esculentum* con diferentes concentraciones de lixiviado de *S. deppei*. Para que las concentraciones de la FSP fueran análogas a las del lixiviado, se determinó la cantidad de proteínas totales del lixiviado acuoso de *S. deppei* y se prepararon suspensiones de la FSP con contenido proteico equivalente. Adicionalmente se utilizó un control positivo de inhibidor de proteasas de serina: PMSF.

Los bioensayos se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar VECO. Se prepararon los siguientes tratamientos: 1) lixivados de *S.*

*deppei* al 2, 1, 0.2 y 0.1 % (m/v) equivalentes a 0.048, 0.024, 0.0048 y 0.0024  $\mu\text{g}$  de proteínas totales /  $\mu\text{L}$  de lixiviado, 2) suspensiones de FPS con concentraciones equivalentes a las de los lixiviados de *S. deppei* y 3) soluciones de PMSF 200, 100, 40 y 20  $\mu\text{M}$ . De cada tratamiento se tomaron 2 mL y se mezclaron con 2 mL de agar al 2% en una caja de petri (6 cm), de este modo, los lixiviados de *S. deppei* tuvieron concentraciones finales de 1, 0.5, 0.1 y 0.05% equivalentes a 0.024, 0.012, 0.0024 y 0.0012  $\mu\text{g}$  de proteínas totales /  $\mu\text{L}$  de lixiviado, las suspensiones de FPS tuvieron las mismas concentraciones que las de los lixiviados de *S. deppei* y PMSF 100, 50, 20 y 10  $\mu\text{M}$ . El control consistió de 2 mL de agua doblemente destilada estéril y 2 mL de agar al 2%. Una vez solidificado el agar, se colocaron 12 semillas de *L. esculentum* en cada caja y se pusieron a germinar en una cámara de crecimiento Conviron a 25°C en completa oscuridad. A las 48 horas de imbibición se evaluó el porcentaje de germinación, considerando como germinadas a todas las semillas que presentaran una radícula de al menos 1 mm de longitud. A las 72 horas de imbibición se midió la longitud de las radículas de todas las semillas con un vernier digital Daigger. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y dos réplicas independientes de cada bioensayo. Los resultados se expresan en porcentaje de germinación a las 48 horas de imbibición y porcentaje de crecimiento radicular con respecto al control a las 72 horas de imbibición. Los datos fueron analizados por un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4. Bioensayos y obtención de tejido para ensayos enzimáticos

Estudios anteriores (Lara-Núñez et al. 2006; Flores-Martínez 2009) mostraron que el lixiviado acuoso de *S. deppei* al 0.5% también afecta la actividad de enzimas del metabolismo central de carbono, del sistema antioxidante y de degradación de carbohidratos de la pared celular del endospermo micropilar en *L. esculentum* (Ver sección 1.3). A fin de relacionar este efecto fitotóxico con la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, se procedió a determinar las actividades de algunas enzimas (Sección 3.5.) en semillas de *L. esculentum* embebidas en las concentraciones inhibitorias del 70% de los tratamientos planteados en las curvas de inhibición. Se escogieron las CI<sub>70</sub> porque a estas concentraciones el efecto inhibitorio de protrusión radicular es evidente, así como el retraso en la germinación.

**Diseño experimental:** se prepararon los siguientes tratamientos: 1) lixiviado acuoso de *S. deppei* al 1% (m/v), 2) una suspensión de la FSP a una concentración de 0.096 µg de proteínas totales / µL y 3) PMSF 90 µM. De cada tratamiento se tomaron 2 mL y se mezclaron con 2 mL de agar al 2% en una caja de petri (6 cm), de este modo, el lixiviado de *S. deppei* tuvo una concentración final del 0.5%, la FSP de 0.048 µg/µL y el PMSF de 0.0078 µg/µL (45 µM). El control consistió de 2 mL de agua doblemente destilada estéril y 2 mL de agar al 2%. Una vez solidificado el agar, se colocaron 25 semillas de *L. esculentum* en cada caja y se pusieron a germinar en una cámara de crecimiento Conviron a 25°C en completa oscuridad. Los tiempos de incubación fueron 12, 24, 36 y 48 horas. Se prepararon 10 cajas por cada tiempo de incubación, para cada tratamiento. Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido, las semillas de cada tratamiento se molieron con mortero y pistilo en nitrógeno líquido. Los tejidos pulverizados se guardaron en un refrigerador REVCO a -70°C para su uso posterior.

### 3.5. Determinación de actividades enzimáticas

#### 3.5.1. Enzimas del metabolismo central de carbono

**Método general:** se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido molido y se homogeneizaron con un politrón (Tissue treader modelo 389) en 750  $\mu$ L de amortiguador de extracción. Los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 3000 g a 4°C durante 15 minutos. A los sobrenadantes se les determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976) e inmediatamente después se analizó la actividad de la enzima de estudio. Las actividades se determinaron en microplaca Costar, mediante el continuo aumento de absorbancia a una longitud de onda determinada durante 15 minutos. Las determinaciones espectrofotométricas para estos ensayos se llevaron a cabo en un lector Biotek ELx 808.

**6 – fosfofructocinasa (EC 2.1.7.11):** la actividad se determinó de acuerdo con el protocolo propuesto por Kruger et al. (1983). El amortiguador de extracción consistió de: Tris-HCl 100 mM pH 8.0,  $MgCl_2$  5 mM, EDTA 1mM,  $\beta$  – mercaptoetanol 28 mM, PMSF 1 mM y PVP 250 mg/mL y el medio de reacción para medir la actividad consistió de: Tris-HCl 100 mM pH 8.0,  $MgCl_2$  5 mM, fructosa – 6 – fosfato 5 mM,  $NADP^+$  0.1 mM, ATP 1 mM, 1 unidad de aldolasa, 10 unidades de triosa-fosfato isomerasa, 1.3 unidades de glicerol – 3 – fosfato deshidrogenasa y 100  $\mu$ L/mL del extracto enzimático. La absorbancia se monitoreó a 340 nm ( $\epsilon = 6220 M^{-1}cm^{-1}$ ).

**Fructosa – 1,6 – bifosfatasa (EC 3.1.3.11):** la actividad se determinó de acuerdo con el protocolo propuesto por Kruger et al. (1984). El amortiguador de extracción consistió de: Tris-HCl 200 mM pH 7.7,  $MgCl_2$  2 mM,  $\beta$  – mercaptoetanol 14 mM, PMSF 1 mM y PVP 2% (m/v) y el medio de reacción para medir la actividad consistió de: HEPES-NaOH 100 mM pH 7.5,  $MgCl_2$  54 nM,  $NADP^+$  0.5 mM,

fructosa – 1,6 - bifosfato, 2 unidades de hexocinasa, 1 unidad de glucosa – 6 – fosfato isomerasa y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del extracto enzimático. La absorbancia se monitoreó a 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

**Malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37):** la actividad se determinó de acuerdo con el protocolo propuesto por Dixon et al. (1959). El amortiguador de extracción consistió de: MOPS-BICINE 100 mM pH 8.2, EDTA 3mM,  $\beta$  – mercaptoetanol 5 mM y PVP 1% (m/v) y el medio de reacción para medir la actividad consistió de: MOPS-BICINE 100 mM pH 8.2, NADH 0.4 mM, Oxaloacetato 0.2 mM y 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del extracto enzimático. La absorbancia se monitoreó a 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

**Isocitrato liasa (EC 4.1.3.1):** la actividad se determinó de acuerdo con el protocolo propuesto por Cooper y Beevers (1969). El amortiguador de extracción consistió de: amortiguador de fosfatos 77.5 mM pH 6.9 DTT 5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM y el medio de reacción para medir la actividad consistió de: amortiguador de fosfatos 77.5 mM pH 6.9 DTT 9 mM,  $\text{MgCl}_2$  10.8 mM, fenilhidracina 10 mM, isocitrato de sodio 13 mM y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del extracto enzimático. La absorbancia se monitoreó a 324 nm ( $\epsilon = 17000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.5.2. Enzimas del sistema antioxidante

**Catalasa (EC 1.11.1.6):** se siguió el método descrito por Jiang y Ziang (2002). Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido molido y se homogeneizaron con un politrón (Tissue treader modelo 389) en 1 mL de amortiguador de extracción: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, EDTA 1mM y PVP al 1% (m/v). Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 3000 g a 4°C durante 15 minutos. A los sobrenadantes se les determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976) e inmediatamente después se analizó la actividad de la catalasa. El medio de reacción para medir la actividad consistió de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del extracto de proteína en un volumen total de 1 mL. Se monitoreó la absorbancia a 240 nm ( $\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) durante

3 minutos en un espectrofotómetro Varian (Varian Australia Pty Ltd., Mulgrave, VIC, Australia).

**Superóxido dismutasa (1.15.1.1):** se siguió el método descrito por Misra y Fridovich (1972). Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido molido y se homogeneizaron con un politrón (Tissue treader modelo 389) en 1 mL de amortiguador de extracción: amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.8, EDTA 0.1mM y PVP al 1% (m/v). Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 3000 g a 4°C durante 15 minutos. A los sobrenadantes se les determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976) e inmediatamente después se determinó la actividad de la superóxido dismutasa. El medio de reacción para medir la actividad consistió de: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM pH 10.2, EDTA 0.5 mM, 2 µL/mL del extracto de proteína y epinefrina 10 mg/mL (disuelta en HCl 10 mM pH 2.0) en un volumen total de 0.5 mL. Se monitoreó la auto-oxidación de la epinefrina a 480 nm ( $\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) cada 10 segundos por 3 minutos en un espectrofotómetro Varian (Varian Australia Pty Ltd., Mulgrave, VIC, Australia). Sólo se consideraron las lecturas posteriores a la etapa estacionaria de la auto-oxidación de la epinefrina.

### 3.5.3. Enzima de degradación de carbohidratos de la pared celular

**$\beta$  – 1,3 – glucanasa (EC 3.2.1.39):** se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido molido y se homogeneizaron con un politrón (Tissue treader modelo 389) en 1 mL de acetato de sodio 15 mM pH 5.5. Los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 3000 g por 15 minutos a 4°C. A los sobrenadantes se les determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976) e inmediatamente después se determinó la actividad de la  $\beta$  – 1,3 – glucanasa. El ensayo se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Salyers et al. (1977) y por Morohashi y Matsushima (2000) con algunas modificaciones: el medio de reacción contenía 0.5 mg de laminarina de *Laminaria digitata*, acetato de sodio 50 µM pH 5.5 y 100 µL del extracto enzimático en un volumen total de 0.4 mL. Esta reacción

se incubó a 37°C por 30 minutos y se paró hirviendo por 5 minutos. Se preparó un control con el mismo medio de reacción pero empleando extracto enzimático hervido. La actividad se evaluó por el incremento de formación de glucosa medida por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD Kit de Sigma - Aldrich).

#### 3.5.4. Procesamiento de datos

La actividad de las enzimas estudiadas se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$Actividad = \frac{m (v)}{\epsilon * g_{proteína}} * FD$$

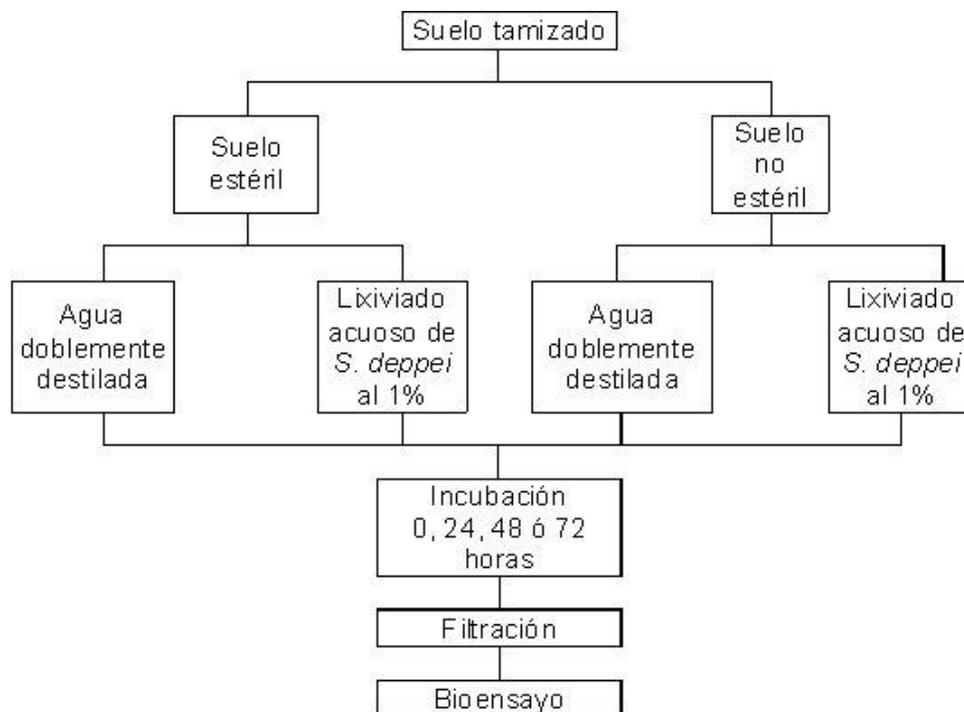
Donde  $m$  es el cambio de absorbancia por minuto,  $v$  es el volumen del ensayo,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar,  $g_{proteína}$  es la cantidad de gramos de proteína adicionado a cada ensayo y  $FD$  es el factor de dilución de la muestra en caso de aplicar. Todas las actividades se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes y se reportan en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}_{proteína}$ . Los resultados fueron analizados por una ANOVA factorial ( $p \leq 0.05$ ) y se compararon las medias con la prueba de Tukey.

#### 3.6. Determinación de la permanencia del efecto alelopático de *S. deppei* en el suelo

La gran mayoría de las interacciones alelopáticas se llevan a cabo en el suelo, ya que éste actúa como el medio de transporte primario de los aleloquímicos de la planta donadora a la receptora. Durante este transporte, la matriz del suelo es capaz de alterar la biodisponibilidad de los aleloquímicos a través de varios procesos como la absorción y degradación química o microbiológica de los mismos (Tharayil et al. 2008). A fin de obtener un panorama más global sobre el efecto alelopático del lixiviado acuoso de *S. deppei*, se procedió a analizar su fitotoxicidad cuando éste entra en contacto con la matriz del suelo.

**Diseño experimental:** se colectó suelo agrícola de la zona de Xochimilco. Para obtener una matriz de tamaño uniforme, el suelo se tamizó a través de una malla No. 20. Posteriormente se colocaron 10 g de suelo tamizado en frascos estériles de vidrio. Para poder observar si el suelo modifica la fitotoxicidad del lixiviado acuoso de *S. deppei* por medio de absorción y/o degradación, los frascos con el suelo se separaron en dos lotes; uno de éstos se esterilizó a 121°C por 15 minutos a 15 PSI, de este modo, se contó con un lote de frascos con suelo estéril y otro con suelo no estéril.

En una campana de flujo laminar VECO, se regó cada frasco al doble de la capacidad de campo con su tratamiento correspondiente. La mitad de cada lote se regó con agua doblemente destilada estéril y la otra mitad con lixiviado acuoso de *S. deppei* al 1% (m/v). Los frascos se taparon con 4 capas de manta de cielo sujeta a la boca del frasco con bandas elásticas. Los frascos se conservaron a 25°C en completa oscuridad durante 0, 24, 48 y 72 horas. La figura 8 muestra el procedimiento seguido.



**Figura 8.** Diagrama de flujo para el experimento de determinación de permanencia del efecto alelopático de *S. deppei* en el suelo.

Terminado el tiempo de incubación se recuperó el líquido del tratamiento filtrando el suelo a través de un filtro Whatman No. 4. Los filtrados resultantes se volvieron a filtrar a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  estéril. De cada filtrado se tomaron 2 mL y se mezclaron con 2 mL de agar al 2% en una caja de petri (6 cm). El control consistió de 2 mL de agua doblemente destilada estéril y 2 mL de agar al 2%. Una vez solidificado el agar, se colocaron 12 semillas de *L. esculentum* en cada caja y se pusieron a germinar en una cámara de crecimiento Conviron a 25°C en completa oscuridad. A las 48 horas de imbibición se evaluó el porcentaje de germinación, considerando como germinadas a todas las semillas que presentaran una radícula de al menos 1 mm de longitud. A las 72 horas de imbibición se midió la longitud de las radículas de todas las semillas con un vernier digital Daigger.

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y dos réplicas por ensayo. Los resultados se expresan en porcentaje de germinación a las 48 horas de imbibición y porcentaje de crecimiento radicular con respecto al control a las 72 horas de imbibición. Los datos fueron analizados por un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ). Adicionalmente, se midió la presión osmótica de cada filtrado en un osmómetro de congelación Osmette A para comprobar que los efectos alelopáticos no se debieran a un efecto osmótico.

### **3.7. Equipos, reactivos y programas empleados**

El análisis estadístico de todos los experimentos se llevó a cabo con el programa STATISTICA versión 6.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Se realizó un análisis de varianza factorial ( $p \leq 0.05$ ) y se compararon las medias con la prueba de Tukey.

#### **Equipos empleados:**

Autoclave STERILEMAX, Harvey

Balanza analítica Explorer OHAUS

Cámara de electroforesis Bio-Rad  
 Campana de flujo laminar VECO, modelo No. 4372  
 Celdas de cuarzo, Sigma - Aldrich  
 Centrífuga Rotina 35 R, Hettich Zentrifugen  
 Espectrofotómetro Varian  
 Filtro Millipore  
 Filtros AMICON  
 Fuente de Poder Bio-Rad modelo 1000/500  
 Lector de microplacas Biotek ELx 808  
 Micropipetas Gilson  
 Parrilla eléctrica con agitador Corning  
 Politrón Tissue tearor modelo 398, BIOSPEC products  
 Potenciómetro PH210, HANNA instruments  
 Refrigerador REVCO modelo ULT2186-4-A41  
 Transiluminador UV ULTRA-LUM / Sistema Gel Logic 100 de Kodak  
 Vernier Digital electrónico DAIGGER LC-2871-AB  
 Vórtex Labnet Vx100

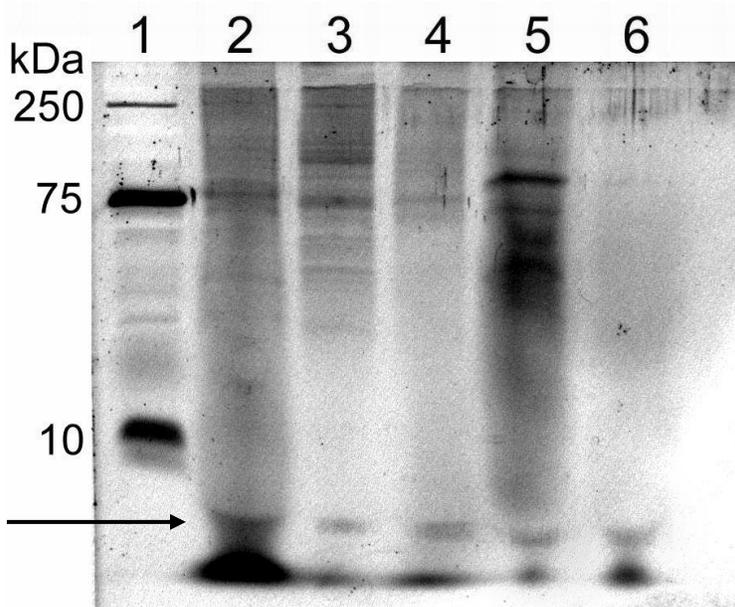
**Reactivos empleados:**

| <b>Proveedor</b> | <b>Reactivo</b>  |
|------------------|--|
| Bio – Rad        | Acrilamida-Bisacrilamida, azul de Coomasie R-250, colorante de Bradford, DTT, Kit de tinción con Rubí SPYRO, persulfato de amonio, SDS, TEMED  |
| J. T. Baker      | Acetato de amonio, ácido acético, citrato de sodio, etanol, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HCl, metanol, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaOH, NH <sub>4</sub> OH, sulfato de amonio  |
| Merck            | 2-mercaptoetanol, agar-agar  |
| Roche            | Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa, hexocinasa   |
| Sigma - Aldrich  | Acetato de sodio, albúmina sérica bovina, aldolasa, ATP, bicine, EDTA, epinefrina, fenilhidracina, formaldehído, fructosa -1,6- fosfato, fructosa -6- fosfato, glucosa - 3 fosfato deshidrogenasa, HEPES, isocitrato de sodio, Kit GOD-POD, laminarina de <i>Laminaria digitata</i> , MgCl <sub>2</sub> , MOPS, NADH, NADP, nitrato de plata, oxaloacetato de sodio, PMSF, PVP, tricina, triosa fosfato deshidrogenasa, tris, urea |

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Purificación parcial de proteínas de bajo peso molecular

El primer paso de la purificación consistió en centrifugar el lixiviado acuoso de *S. deppei* (20% m/v) para eliminar posibles impurezas superficiales de los tallos y las hojas colectadas. El siguiente paso fue una desnaturalización por calor para eliminar la mayor cantidad de proteínas de alto peso molecular posible. Posteriormente se realizó una precipitación con sulfato de amonio, se encontró que la fracción al 55% estaba enriquecida con proteínas de bajo peso molecular. Finalmente se pasó ésta fracción a través de una columna Amicon® con poro de 10 kDa.

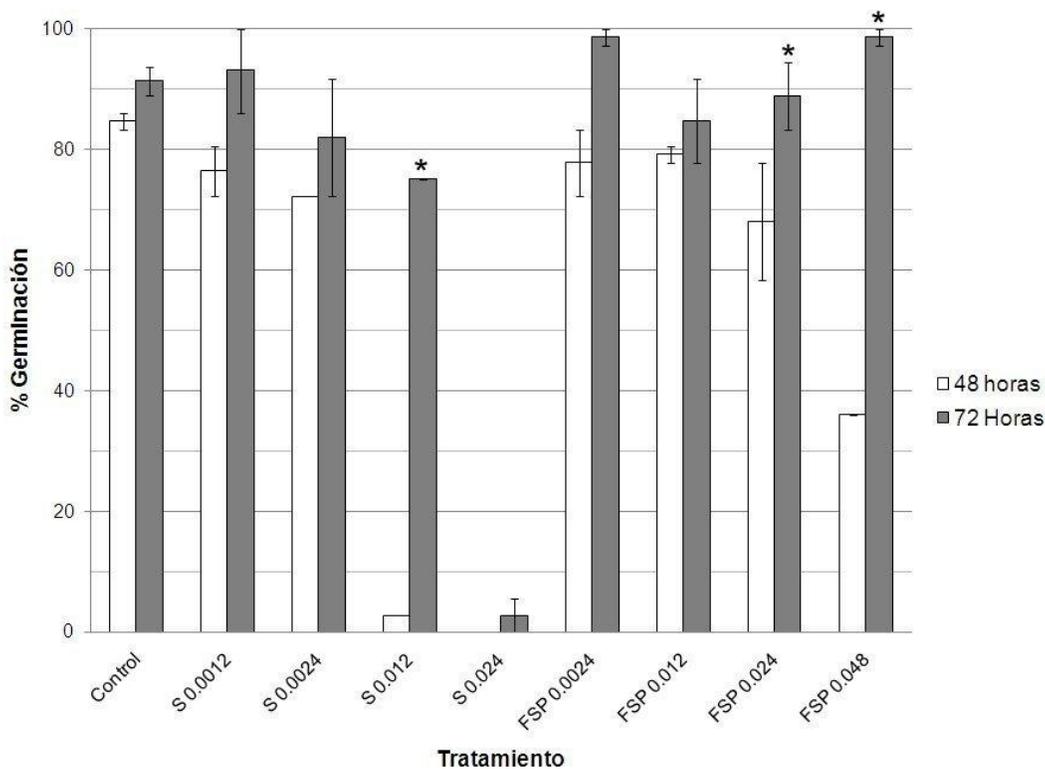


**Figura 9.** SDS-PAGE del proceso de purificación de las proteínas de bajo peso molecular a partir de un lixiviado acuoso de *S. deppei* (20% m/v) teñido con SPYRO® rubí. Carriles: 1) Estándares de peso molecular. 2) Lixiviado acuoso de *S. deppei* 20% m/v. 3) Lixiviado acuoso de *S. deppei* después de remover las impurezas. 4) Sobrenadante obtenido después de la desnaturalización por calor. 5) Fracción de la precipitación con sulfato de amonio al 55%. 6) Fracción después de pasar por la columna Amicon® con poro de 10 kDa. La flecha indica la banda correspondiente a las proteínas de bajo peso molecular.

La figura 9 muestra el gel obtenido en la electroforesis descrita anteriormente. En éste, se observa la presencia constante de una banda correspondiente a proteínas con peso molecular menor a 10 kDa en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y en las fracciones obtenidas en el proceso de purificación. En un experimento anterior, realizado en el laboratorio de Alelopatía, se comprobó que la fracción de bajo peso molecular tiene un peso promedio de 3 kDa e inhibe la actividad de la tripsina significativamente (artículo en preparación).

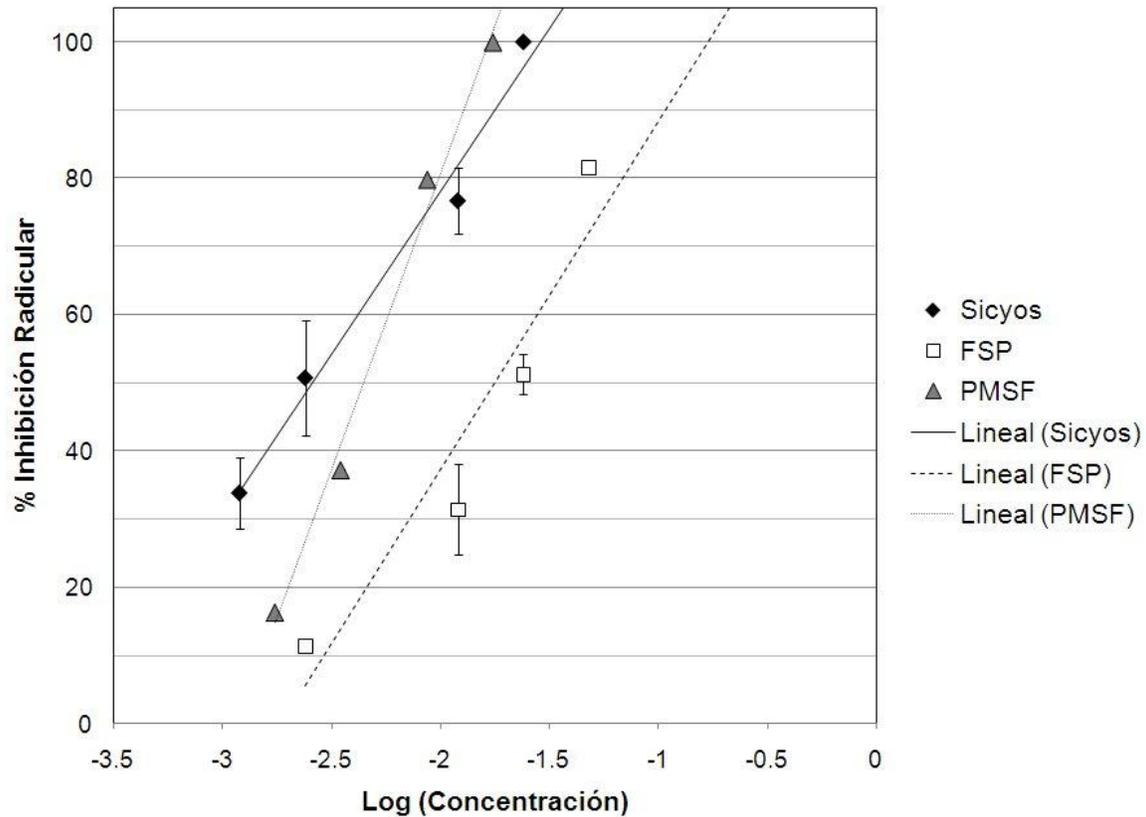
#### **4.2. Curvas dosis-respuesta de germinación y elongación radicular de *L. esculentum***

El lixiviado acuoso de *S. deppei* al 0.5% (m/v) retrasa la germinación de *L. esculentum* e inhibe significativamente el crecimiento radicular (70%) (Romero-Romero et al. 2005). Con base en estos trabajos, se realizó una curva de dosis-respuesta para determinar la germinación de *L. esculentum* con diferentes concentraciones de lixiviado acuoso de *S. deppei* y concentraciones equivalentes de la FSP. Se evaluó el porcentaje de germinación a las 48 y 72 horas de imbibición. La figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos.



**Figura 10.** Porcentaje de germinación de semillas de *L. esculentum* a las 48 y 72 horas de imbibición con diferentes concentraciones de lixiviado acuoso de *S. deppei* (S) y FSP. Se presenta el promedio de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. El control se refiere a la imbibición de las semillas en agua doblemente destilada, los valores indicados junto a los tratamientos corresponden a la concentración de proteínas totales de cada tratamiento en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Los asteriscos indican diferencia significativa a  $p \leq 0.05$ .

En la figura 10, se observa un retraso en la germinación de las semillas de *L. esculentum* embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* al 0.5% (m/v), cuya concentración de proteínas totales es de  $0.012 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Este retraso no se observa en las semillas embebidas en FSP  $0.012 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; sin embargo en las semillas embebidas en concentraciones mayores de FSP ( $0.024$  y  $0.048 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), muestran un retraso en la germinación cada vez más marcado a las 48 horas.



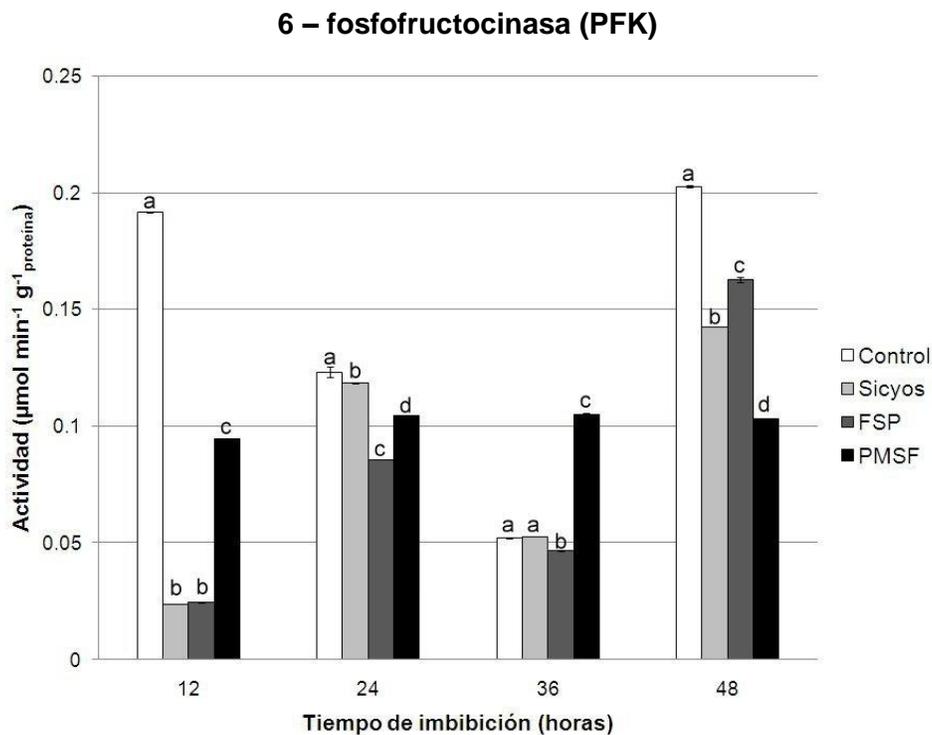
**Figura 11.** Curvas dosis-respuesta gradual de lixiviado acuoso de *S. deppei*, FSP y PMSF sobre la elongación radicular de *L. esculentum*. Se presenta el promedio de 3 réplicas  $\pm$  error estándar.

La concentración de proteínas totales presentes en el lixiviado acuoso de *S. deppei* se tomó como referencia; conociendo que en presencia de  $0.012 \mu\text{g}$  de proteínas totales /  $\mu\text{L}$  de lixiviado hay un retraso significativo en la germinación y que esta concentración corresponde a la  $CI_{70}$  de elongación radicular, se calculó la  $CI_{70}$  de la FSP y del PMSF para estandarizar las concentraciones en los bioensayos para evaluar las actividades enzimáticas planteadas. A partir de este cálculo, las concentraciones seleccionadas para cada tratamiento fueron:  $0.048 \mu\text{g}$  de proteínas totales/  $\mu\text{L}$  de FSP y  $0.0078 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $45 \mu\text{M}$ ) de PMSF.

### 4.3. Enzimas del metabolismo central de carbono

Se compararon los efectos de las  $Cl_{70}$  del lixiviado acuoso de *S. deppei*, la FSP y PMSF sobre las actividades de algunas enzimas del metabolismo central de carbono durante la germinación de *L. esculentum*. Las enzimas estudiadas son representativas de diferentes vías metabólicas: glucólisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato. Éstas fueron seleccionadas de acuerdo con el esquema de estudio propuesto para el proyecto PAPIIT (IN205705) del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM.

**6 – fosfofructocinasa EC 2.1.7.11 (PFK):** es una de las enzimas principales de la glucólisis, se encarga de fosforilar a la fructosa – 6 – fosfato produciendo fructosa – 1,6 – bifosfato. La figura 12 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.

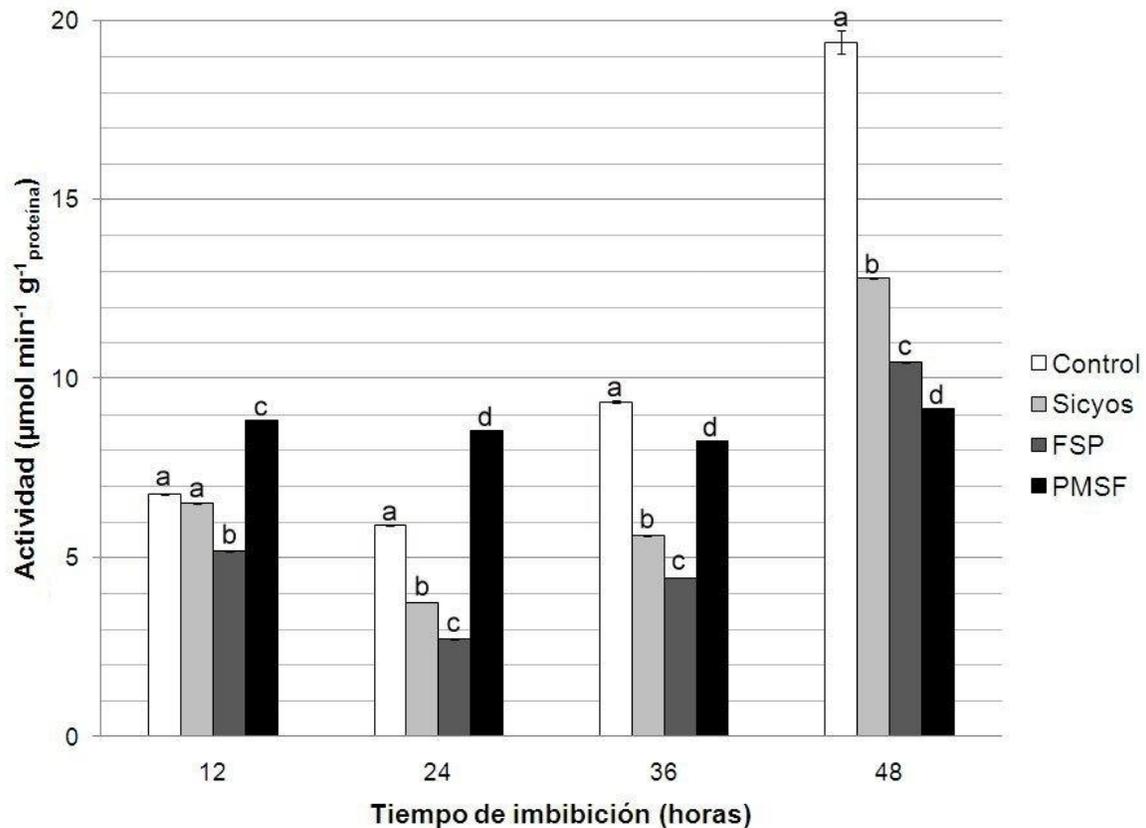


**Figura 12.** Actividad de la PFK. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 12 se observa que, en las semillas del control, la actividad de la PFK disminuye hasta las 36 horas, pero vuelve a aumentar a las 48 horas. Por el contrario, en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* se observa un 90% de inhibición de la actividad de la PFK a las 12 horas, a las 24 horas esta diferencia se aminora, a las 36 horas no hay diferencia entre las actividades de las semillas del control y las embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*; sin embargo, a las 48 horas la actividad aumenta pero es 30% menor que la que presentan las semillas del control. En cuanto a las semillas embebidas en la FSP, a las 12 horas, la actividad de esta enzima presenta la misma inhibición que las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*, a las 24 horas la actividad aumenta pero es 25% menor que la que presentan las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*. A las 36 horas de imbibición, la diferencia entre la actividad de las semillas del control, las embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* y en la FSP es del 10%. A las 48 horas de imbibición, la actividad de la PFK aumenta, siendo 20% menor que la presentada en las semillas del control, pero 14% mayor en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*. A pesar de las diferencias entre los valores obtenidos para las actividades de PFK en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* y las embebidas en FSP, se puede observar que la actividad es similar. En las semillas embebidas en PMSF la actividad de esta enzima presenta un comportamiento uniforme a lo largo de todos los tiempos.

**Fructosa – 1,6 – bifosfatasa EC 3.1.3.11 (FBPasa):** es una de las principales enzimas de la gluconeogénesis y se encarga de catalizar la conversión de la fructosa – 1,6 – bifosfato a fructosa – 6 – fosfato. La figura 13 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.

### Fructosa – 1,6 – bifosfatasa (FBPasa)

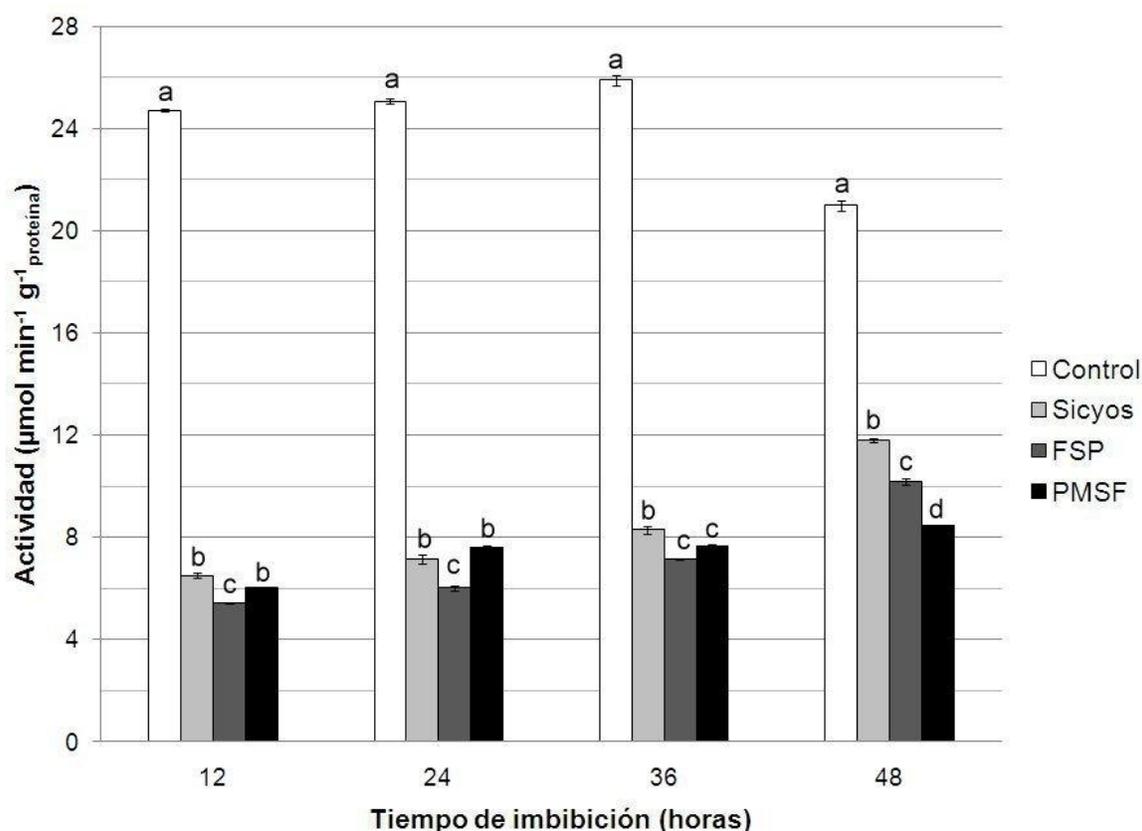


**Figura 13.** Actividad de la FBPasa. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 13 se observa que, en las semillas del control, la actividad de la FBPasa disminuye a las 24 horas de imbibición y posteriormente presenta un aumento gradual a las 36 y 48 horas. En las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* no se presentan diferencias significativas en la actividad de la FBPasa a las 12 horas, pero a partir de las 24 horas la actividad de la FBPasa de estas semillas presenta una inhibición constante del 36% con respecto a la actividad que presentan las semillas del control. La actividad de la FBPasa en las semillas embebidas en la FSP sigue la misma tendencia que la presentada en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* pero los valores son 20% menores. En las semillas embebidas en PMSF la actividad de esta enzima presenta un comportamiento uniforme a lo largo de todos los tiempos.

**Malato deshidrogenasa EC 1.1.1.37 (MDH):** esta enzima participa en el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y se encarga de catalizar la conversión de L- malato a oxaloacetato, cerrando el ciclo. La figura 14 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.

### Malato deshidrogenasa (MDH)

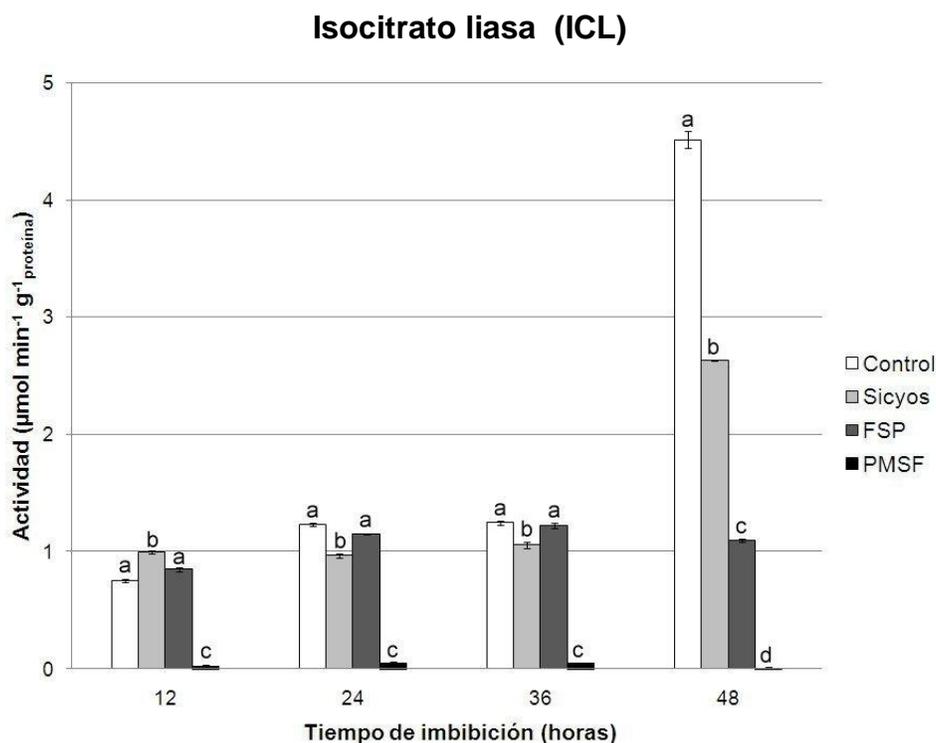


**Figura 14.** Actividad de la MDH. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 14 se observa que, en las semillas del control, la actividad de MDH cambia hasta las 48 horas cuando disminuye un 15%. En las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* la actividad de la MDH se inhibe en un 70% con respecto al control a las 12, 24 y 36 horas de imbibición, pero a las 48 horas esta inhibición es menor (40%). En las semillas embebidas en la FSP la actividad de la

MDH es en promedio 15% menor que la presentada en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* en todos los tiempos de imbibición. En las semillas embebidas en PMSF la actividad de la MDH se inhibe uniformemente en un 72% con respecto a las semillas del control. La actividad de esta enzima se inhibe significativamente en todos los tratamientos con respecto al control. Las semillas embebidas en la FSP presentan la mayor inhibición de actividad de MDH, pero muestra una tendencia similar a la observada en las semillas embebidas en el lixiviado de *Sicyos*.

**Isocitrato liasa EC 4.1.3.1 (ICL):** es una enzima específica del ciclo de glioxilato que es una modificación del TCA, omitiendo las etapas de descarboxilación y permitiendo la producción de esqueletos de carbono sin la pérdida por CO<sub>2</sub>. La figura 15 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.



**Figura 15.** Actividad de la ICL. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

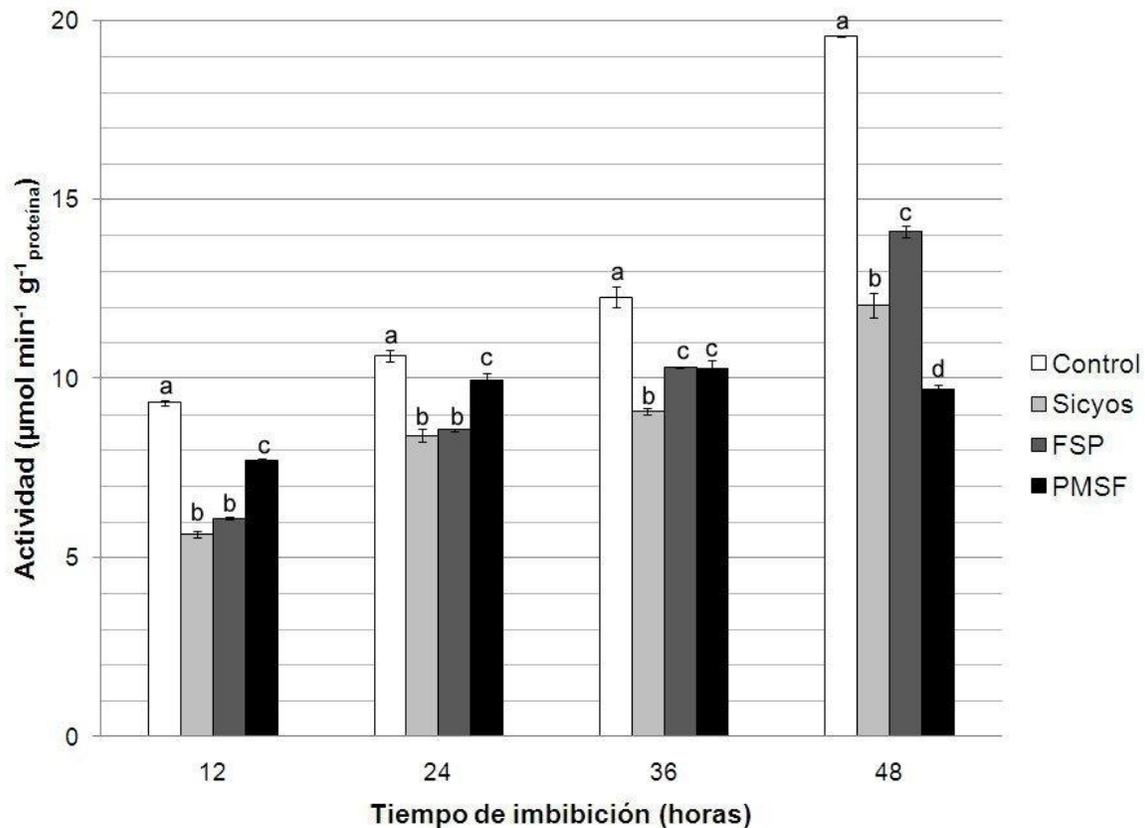
En la figura 15 se observa que, en las semillas del control, la actividad de la ICL es constante hasta las 36 horas, pero a las 48 horas aumenta 3 veces su valor. En las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* la actividad de la ICL se inhibe un 20% durante los tres primeros tiempos con respecto al control, pero a las 48 horas, la inhibición aumenta hasta un 40%. En las semillas embebidas en la FSP, no hay diferencias significativas en la actividad de la ICL con respecto a las semillas del control, pero a las 48 horas de imbibición, la actividad es 75% menor que la de las semillas del control. En las semillas embebidas en PMSF la actividad de esta enzima presenta una inhibición del 100% a lo largo de todos los tiempos.

#### **4.4. Enzimas del sistema antioxidante**

Estudios anteriores en el laboratorio han mostrado que el estrés aleloquímico causado por el lixiviado acuoso de *S. deppei* también causa un estrés oxidante (Lara-Núñez et al. 2006), por lo que se compararon los efectos las  $Cl_{70}$  del lixiviado acuoso de *S. deppei*, la FSP y PMSF sobre las actividades de la catalasa y de la superóxido dismutasa de las semillas embebidas en estos tratamientos, con el fin de relacionar el desbalance en el sistema antioxidante reportado con la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*.

**Catalasa EC 1.11.1.6 (CAT):** esta enzima se encarga de consumir peróxido de hidrógeno, una de las especies reactivas de oxígeno que participan en el estrés oxidante. La figura 16 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.

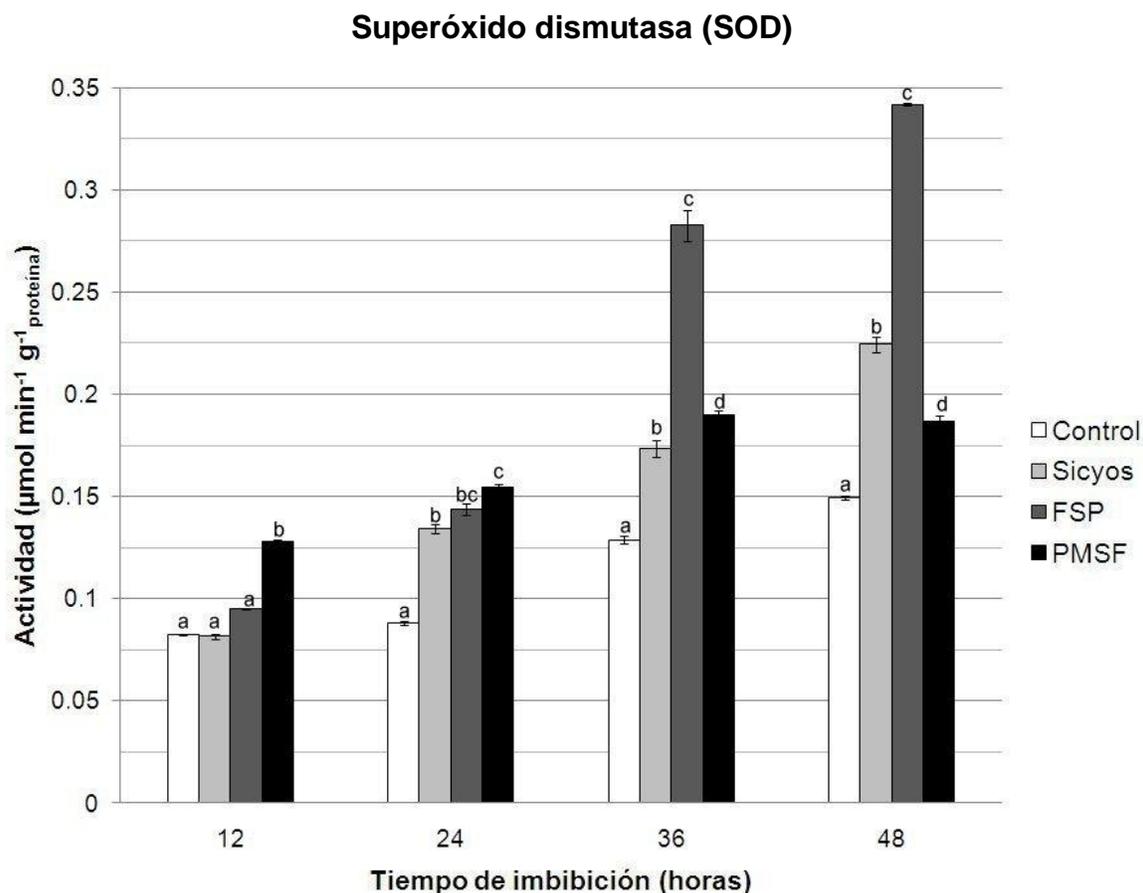
### Catalasa (CAT)



**Figura 16.** Actividad de la CAT. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 16 se observa que la actividad de la CAT aumenta de forma gradual en las semillas del control a lo largo del tiempo. La actividad de la CAT en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* muestra una tendencia similar a la observada en las semillas del control, pero la actividad es significativamente menor (20-40%). En las semillas embebidas en la FSP, la actividad de la CAT muestra un comportamiento similar al observado en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* hasta las 24 horas; a las 36 y 48 horas la actividad es 15% mayor que en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* pero 30% menor que en las semillas del control. En las semillas embebidas en PMSF, la actividad presenta un aumento a las 24 horas y se mantiene constante a lo largo del tiempo.

**Superóxido dismutasa EC 1.15.1.1 (SOD):** esta enzima se encarga de dismutar el anión superóxido, una de las especies reactivas de oxígeno que participan en el estrés oxidante. La figura 17 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.



**Figura 17.** Actividad de la SOD. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 17 se observa que la actividad de la SOD aumenta de forma gradual en las semillas del control a lo largo del tiempo. En las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*, la actividad de la SOD no presenta diferencias significativas con la observada las semillas del control a las 12 horas, sin embargo, en los demás tiempos de imbibición, la actividad aumenta hasta 1.5 veces con respecto a las semillas del control. En las semillas embebidas en la FSP la

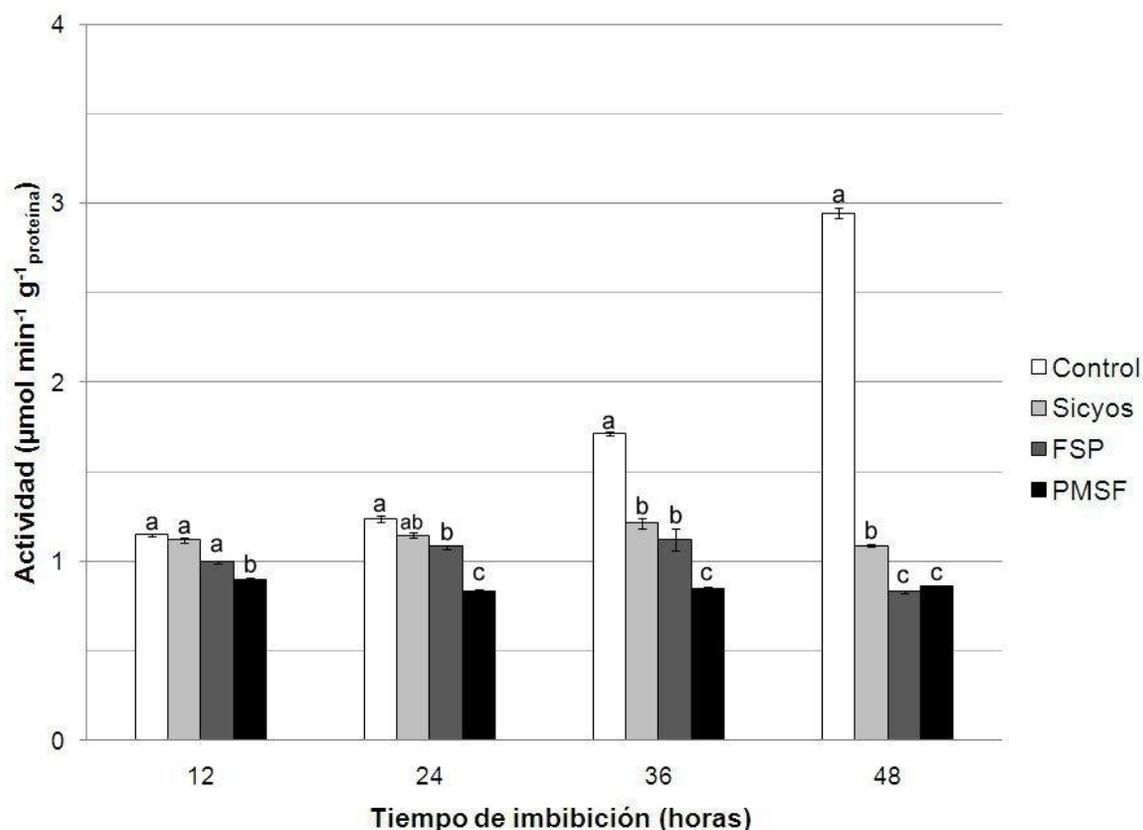
actividad de la SOD no presenta diferencias significativas con la observada en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* hasta las 24 horas, pero a las 36 y 48 horas de imbibición, la actividad es 1.5 veces mayor que la presentada en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*. Las semillas embebidas en PMSF también presentan un aumento en la actividad de la SOD a lo largo de la germinación con respecto al control, pero el aumento en la actividad es 50% menor que el presentado en las semillas embebidas en la FSP.

#### **4.5. Enzima de degradación de carbohidratos de la pared celular**

Las enzimas de degradación de carbohidratos de la pared celular permiten el debilitamiento del endospermo para facilitar la protrusión de la radícula durante la germinación. En el laboratorio de Alelopatía se estudió el efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre la actividad de varias de estas enzimas (Lara-Núñez et al. 2006). Con el fin de relacionar estos efectos con la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, se seleccionó la  $\beta$  – 1,3 – glucanasa por la simplicidad para determinar su actividad y porque el efecto alelopático del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre esta enzima es notable.

**$\beta$  – 1,3 – glucanasa EC 3.2.1.39:** esta enzima se encarga de hidrolizar los glucanos de la pared celular del endospermo. La figura 18 muestra la actividad de esta enzima bajo los tratamientos anteriormente planteados a diferentes horas durante la germinación de *L. esculentum*.

### $\beta$ - 1,3 - glucanasa

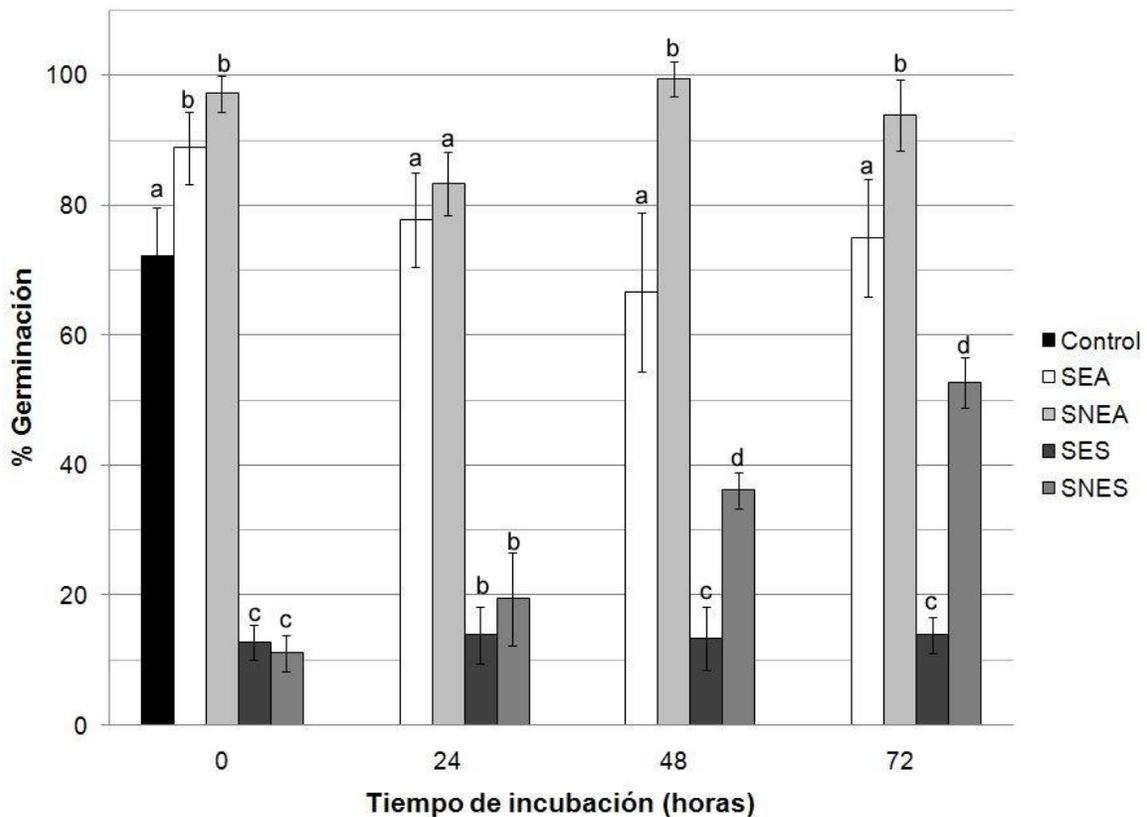


**Figura 18.** Actividad de la  $\beta$  - 1,3 - glucanasa. Se presentan los promedios de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de imbibición se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 18 se observa que, en las semillas del control, hay un incremento gradual en la actividad de esta enzima durante la germinación, a las 48 horas de imbibición la actividad es 3 veces mayor a la observada a las 12 horas, lo cual concuerda con la protrusión de la radícula. En las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos*, y en la FSP no se observa este aumento en la actividad, de hecho la actividad de esta enzima es constante. En las semillas embebidas en PMSF la actividad de esta enzima también es constante pero 25% menor que la observada en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *Sicyos* y en la FSP.

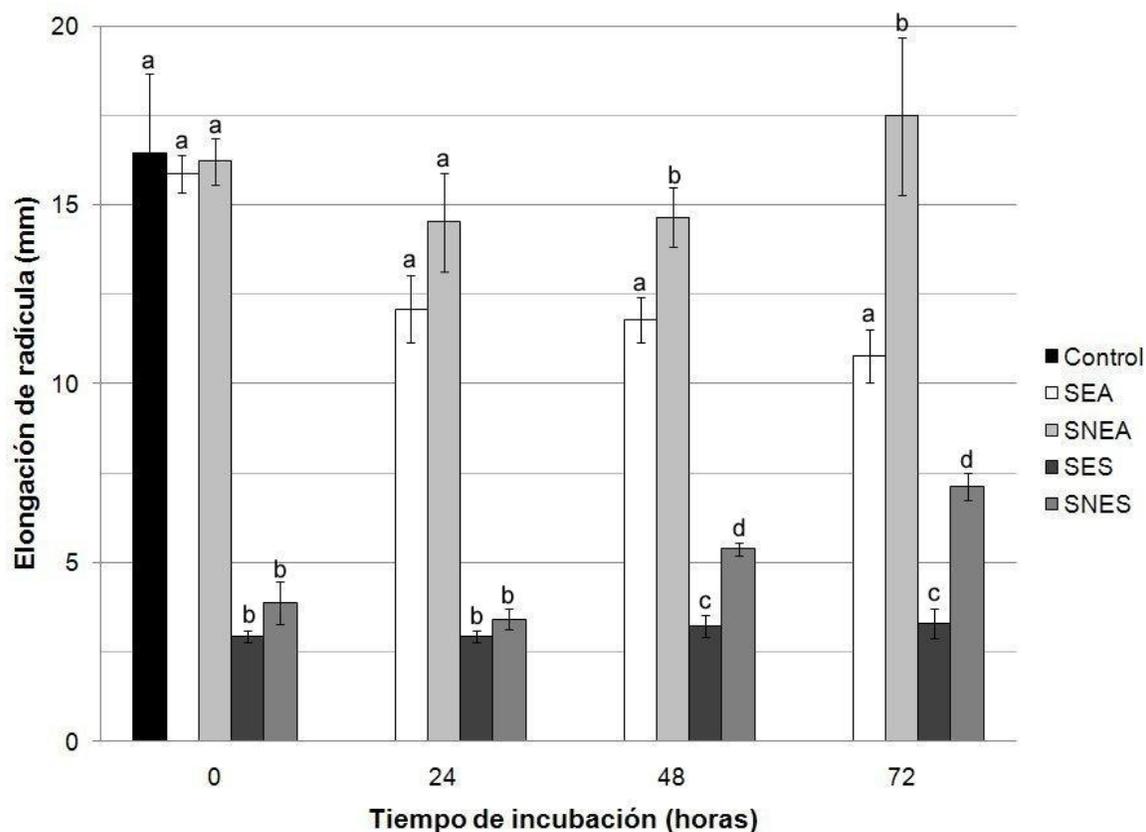
#### 4.6. Permanencia del efecto alelopático de *S. deppei* en el suelo

Con el fin de demostrar que el efecto alelopático de *S. deppei* permanece en el suelo, se monitoreó el porcentaje de germinación y la elongación radicular de semillas de *L. esculentum* embebidas en lixiviados de suelo estéril y no estéril con dos tratamientos diferentes: agua y lixiviado acuoso de *S. deppei* al 0.5% (M/V) a diferentes tiempos de incubación del suelo con tratamiento. Las figuras 19 y 20 muestran los resultados obtenidos:



**Figura 19.** Porcentaje de germinación de semillas de *L. esculentum* embebidas en diferentes lixiviados de suelo. El control se refiere a agua doblemente destilada estéril, SEA es suelo estéril con agua doblemente destilada, SNEA es suelo no estéril con agua doblemente destilada, SES es suelo estéril con lixiviado acuoso de *Sicyos*, SNES es suelo no estéril con lixiviado acuoso de *Sicyos*. Se presentan los promedios de dos experimentos independientes de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de incubación se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 19 se observa que las semillas embebidas en filtrados de suelo regado con agua presentan un mayor porcentaje de germinación que las semillas del control; en el tratamiento de agua en suelo no estéril se presenta el mayor porcentaje de germinación (100%). Las semillas embebidas en los tratamientos con filtrados de suelo con lixiviado acuoso de *S. deppei* se observa que el porcentaje de germinación es notablemente menor; en suelo estéril este porcentaje se mantiene constante (10%). En suelo no estéril el efecto se mantiene hasta las 24 horas de incubación y empieza a aumentar conforme se incuba por más tiempo el suelo con el lixiviado acuoso de *Sicyos*. Sin embargo, aun a las 72 horas de incubación hay un 50% de retraso de la germinación.



**Figura 20.** Elongación radicular de semillas de *L. esculentum* embebidas en diferentes lixiviados de suelo. El control se refiere a agua doblemente destilada estéril, SEA es suelo estéril con agua doblemente destilada, SNEA es suelo no estéril con agua doblemente destilada, SES es suelo estéril con lixiviado acuoso de *Sicyos*, SNES es suelo no estéril con lixiviado acuoso de *Sicyos*. Se presentan los promedios de dos experimentos

independientes de 3 réplicas  $\pm$  error estándar. Para cada tiempo de incubación se realizó una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), las letras distintas indican resultados significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la figura 20 se observa que las semillas embebidas en los filtrados de suelo con agua presentan una longitud radicular comparable con la de las semillas del control. Las semillas embebidas con filtrado de suelo con lixiviado acuoso de *S. deppei* presentan inhibición radicular; en los tratamientos con filtrados de suelo estéril con lixiviado acuoso de *S. deppei*, las semillas presentan inhibición radicular constante del 70% con respecto al control, lo cual es consistente con lo reportado (Romero-Romero et al. 2005), pero en los tratamientos con filtrados de suelo no estéril con lixiviado acuoso de *S. deppei* se observa que a partir de las 48 horas de incubación, la inhibición radicular de las semillas empieza a disminuir; sin embargo, aun a las 72 horas de incubación la elongación radicular presenta una inhibición del 50% con respecto al control.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1. Presencia de proteínas de bajo peso molecular

Un consenso común es que los aleloquímicos son compuestos de naturaleza orgánica; metabolitos secundarios como terpenos, isoprenoides, alcaloides, etc. Se han realizado estudios exhaustivos sobre el lixiviado acuoso de *S. deppei* con el fin de caracterizar los compuestos químicos que podrían causar los efectos fitotóxicos que se han reportado, pero no se había tenido éxito. A partir de la información disponible sobre la presencia de inhibidores de proteasas de serina en miembros de la familia *Cucurbitaceae* (Mar et al. 1996; Laure et al. 2006; Kowalska et al. 2007), se exploró la posibilidad de la presencia de proteínas de bajo peso molecular (posiblemente un inhibidor de proteasas de serina entre ellas) en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y que éstas fueran responsables de los efectos fitotóxicos que se han estado estudiando. De acuerdo con la información disponible sobre los inhibidores de proteasas de serina del tipo calabaza (inhibidores de tripsina), se diseñó un proceso de purificación que permitiera poner en evidencia la presencia de este tipo de proteínas y obtener la mayor cantidad de materia prima con la cual realizar los siguientes experimentos.

En la figura 9, se observa la presencia de una banda correspondiente a proteínas de peso molecular menor a 10 kDa. Como se mencionó anteriormente, en experimentos previos, realizados en el laboratorio de Alelopatía, se comprobó que la fracción de bajo peso molecular tiene un peso promedio de 3 kDa e inhibe la actividad de la tripsina significativamente (artículo en preparación). Con los resultados de este estudio, se confirmó la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*.

## **5.2. Retraso en la germinación e inhibición de elongación radicular de *L. esculentum***

Una vez que se confirmada la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, se buscó determinar si éstas participan en el efecto fitotóxico que se ha observado sobre *L. esculentum*. Se determinó el contenido protéico del lixiviado acuoso para poder preparar concentraciones de tratamientos a probar en curvas dosis-respuesta sobre la germinación y elongación radicular de *L. esculentum*, paralelamente se utilizó un inhibidor de proteasas de serina comercial (PMSF) como control positivo.

En semillas embebidas en agua la protrusión de radícula empieza a las 48 horas, por lo que la germinación de las semillas embebidas en los demás tratamientos se evaluó a dos tiempos, 48 y 72 horas, puesto que se ha reportado que en presencia de lixiviado acuoso de *S. deppei* la germinación se retrasa (Romero-Romero et al. 2005). En la figura 10 se observa que hay un retraso en la germinación de semillas de *L. esculentum* embebidas en lixiviado acuoso de *S. deppei* a partir de la concentración de 0.012  $\mu\text{g}$  de proteínas / $\mu\text{L}$ . Este retraso no se presenta en las semillas embebidas en FSP 0.012  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; sin embargo en las semillas embebidas en concentraciones mayores de FSP, empiezan a presentar un retraso en la germinación cada vez más marcado. De este modo se confirma que las proteínas de bajo peso molecular presentes en el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa un retraso en la germinación de *L. esculentum*.

En la curva dosis-respuesta para elongación radicular de *L. esculentum* (Figura 11) se observa que en todos los tratamientos, conforme aumenta la concentración, disminuye la longitud de la radícula. Interesantemente la curva del lixiviado acuoso de *S. deppei* es paralela a la de la FSP, éste fenómeno se puede interpretar como una equivalencia tóxica, lo cual sugiere que el efecto fitotóxico de la FSP sobre la elongación radicular de *L. esculentum* es equivalente al de *S. deppei*. A pesar de

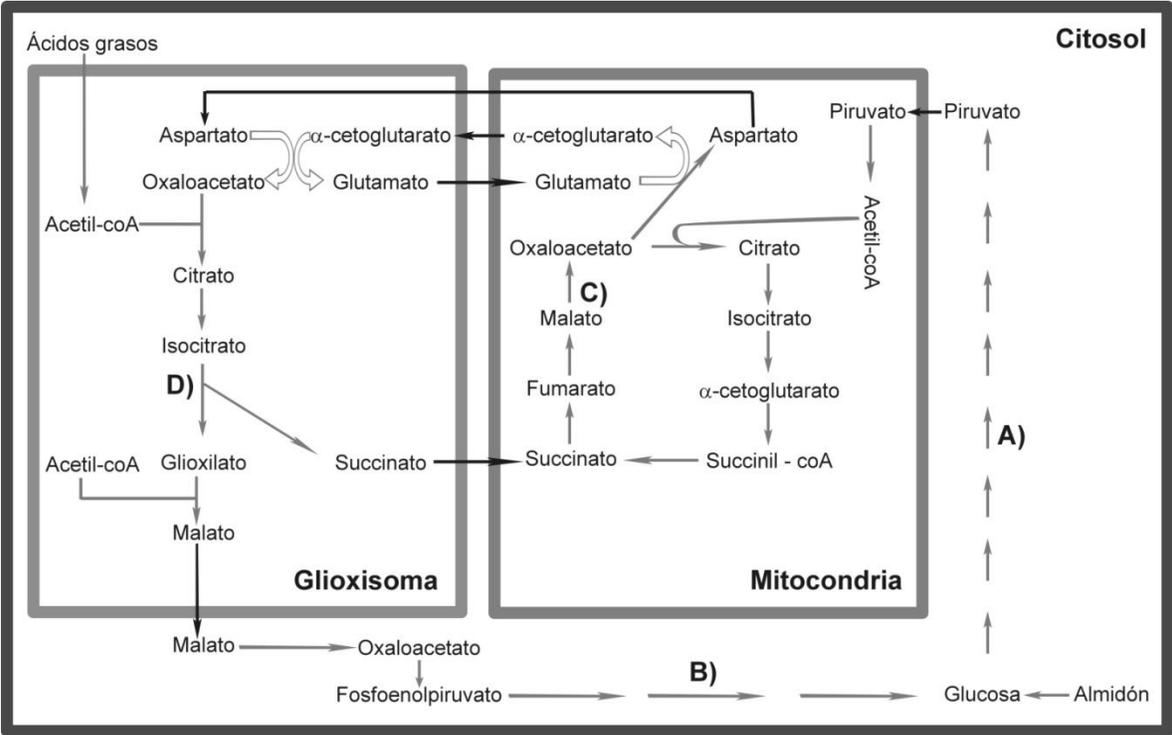
esto, la concentración proteica de la FSP tiene que ser mayor que las del lixiviado de *S. deppei* para que se pueda observar el mismo efecto fitotóxico, por esta razón se estandarizaron las concentraciones de los tratamientos (Cl<sub>70</sub>) para realizar los experimentos posteriores.

### 5.3. Enzimas del metabolismo central de carbono

Durante la germinación la movilización de las reservas de los órganos de almacenamiento, o bien, del endospermo proporciona la energía para el crecimiento y la emergencia de la radícula. Las reservas de las semillas consisten de moléculas complejas no solo de carbohidratos sino de proteínas y lípidos (Bewley y Black, 1994). La composición de las semillas de *L. esculentum* se ha estudiado ampliamente con datos que reportan: 14.6 – 29.6 % de lípidos crudos, 14.8 – 41.8% de fibra cruda, 2.9 – 5.4% de carbohidratos y 22.9 – 36.8% de proteína cruda. (Cantarelli et al. 1993). Los ácidos grasos son almacenados en triacilgliceroles (TAG), y su catabolismo, a través de la  $\beta$ -oxidación dentro de los peroxisomas, produce unidades de acetil-CoA y finalmente succinato por la vía del ciclo del glioxilato. Posteriormente, el proceso de glucólisis suministra, durante la germinación de las semillas, la energía necesaria para el desarrollo de la plántula.

Estudios anteriores sobre el metabolismo de los carbohidratos, junto con los antecedentes anteriormente publicados (Romero-Romero et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2006) indican que el estrés aleloquímico provocado por el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa un severo daño en el metabolismo de las semillas de *L. esculentum*, ya que hay una alteración en el metabolismo de los carbohidratos. Esta alteración puede explicar, en parte, el retraso en la emergencia y la inhibición del 70% de la radícula observada en las semillas expuestas a este estrés. De acuerdo con las curvas de dosis-respuesta realizadas, la FSP y el lixiviado acuoso de *S. deppei* se podrían considerar como equivalentes fitotóxicos, por lo tanto, se esperaría que los mecanismos de acción fisiológica de estos aleloquímicos sean semejantes. De este modo, se profundizó en el metabolismo central de carbono

de *L. esculentum* mediante el análisis de las actividades de enzimas representativas de diferentes vías metabólicas durante la germinación de semillas embebidas en los diferentes tratamientos.



**Figura 21.** Esquema de las vías metabólicas estudiadas. Simbología: A) PFK, B) FBPasa, C) MDH y D) ICL.

La PFK dependiente de ATP es una de las principales enzimas de la glucólisis. Esta enzima fosforila a la fructosa – 6 – fosfato produciendo fructosa – 1,6 – bifosfato. La figura 12 muestra que la actividad de esta enzima es significativamente menor a las 12, 36 y 48 horas de imbibición en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y en la FSP. Aunque las actividades en las semillas embebidas en estos dos tratamientos son diferentes (las semillas embebidas en FSP presentan menor actividad aún), ambos tratamientos inhiben la actividad de la PFK con la misma tendencia. La FBPasa es una de las principales enzimas de la gluconeogénesis y se encarga de catalizar la conversión de la fructosa – 1,6 – bifosfato a fructosa – 6 – fosfato. La figura 13 muestra que la actividad de esta enzima se inhibe significativamente a partir de las

24 horas de imbibición en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* (36% de inhibición) y en la FSP (43% de inhibición) con la misma tendencia. La MDH participa en el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y se encarga de catalizar la conversión de L- malato a oxaloacetato, cerrando el ciclo. La figura 14 muestra que la actividad de esta enzima se inhibe significativamente durante todos los tiempos de germinación en semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* (70% de inhibición) y la FSP (85% de inhibición) con la misma tendencia. La ICL es una enzima específica del ciclo de glioxilato. La figura 15 muestra que la actividad de esta enzima se inhibe (20%) durante todos los tiempos de imbibición en semillas embebidas en lixiviado acuoso de *S. deppei*, pero en semillas embebidas en FSP no se observa esta inhibición hasta las 48 horas de imbibición.

Con base en lo expuesto anteriormente se debe notar que en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y de la FSP las enzimas representativas de la glucólisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato presentan inhibición con tendencias similares para ambos tratamientos, lo cual podría implicar que el estrés aleloquímico atribuido a *S. deppei* se deba, en parte, a la presencia de proteínas de bajo peso molecular en su lixiviado acuoso. Parte de las diferencias entre ambos tratamientos se pueden deber a las propiedades inherentes de los mismos; el primero es el lixiviado completo y el segundo se trata de un aleloquímico más puro y concentrado.

Por otro lado, la razón por la cual se observa inhibición en las actividades de las enzimas del metabolismo central del carbono estudiadas queda por esclarecerse. Estudios previamente realizados mostraron que, en semillas de *L. esculentum* embebidas en lixiviado acuoso de *S. deppei*, hay un retraso en la hidrólisis del almidón, y un desequilibrio en los niveles de sacarosa, fructosa y glucosa (Lara-Núñez et al. 2006), este retraso podría tener como consecuencia un desequilibrio en las vías metabólicas estudiadas.

#### 5.4. Enzimas del sistema antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico ( $O_2$ ). Generalmente resultan de la excitación del  $O_2$  para formar oxígeno singulete ( $O_2^1$ ) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al  $O_2$  para formar, respectivamente, el radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Estas especies son capaces de oxidar varios componentes celulares y pueden llevar a la destrucción oxidativa de la célula. Existen varias fuentes de ERO en las células vegetales, muchas se producen en reacciones normales del metabolismo como la fotosíntesis y la respiración celular. Otras fuentes pertenecen a vías activas durante el estrés biológico como la glicolato oxidasa, peroxisomas, NADPH oxidasas, etc. (Mittler, 2002).

Las ERO se producen continuamente durante el desarrollo de las semillas, desde la embriogénesis hasta la germinación. Estas especies juegan un papel dual en la fisiología de las semillas, por un lado actúan en las vías de señalización celular y por otro lado, como productos tóxicos que se acumulan durante el estrés causando daño celular como peroxidación de lípidos de membrana, oxidación de proteínas, inhibición enzimática y daño al DNA y RNA. Dado este papel dual de las ERO, las células tienen diferentes enzimas y metabolitos antioxidantes para regular las concentraciones intracelulares de ERO y mantener la homeostasis (Foyer, 2005).

Estudios anteriores sobre el sistema antioxidante, junto con los antecedentes anteriormente publicados (Romero-Romero et al. 2005, Lara-Núñez et al. 2006) indican que el estrés aleloquímico provocado por el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa un estrés oxidante durante la germinación de semillas de *L. esculentum*, ya que hay cambios en enzimas del sistema antioxidante y en las concentraciones de ERO. De acuerdo con los objetivos planteados, se buscó relacionar el estrés aleloquímico de *S. deppei* con la presencia de proteínas de bajo peso molecular en su lixiviado acuoso, por lo tanto se comparó el efecto del lixiviado acuoso de *S.*

*deppei* con el de la FSP obtenida sobre las actividades de las enzimas CAT y SOD durante la germinación de semillas de *L. esculentum*.

La figura 16 muestra que la actividad de la CAT se inhibe significativamente (20-40% de inhibición) en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y en la FSP durante todos los tiempos de imbibición. Aunque las actividades en las semillas embebidas en estos dos tratamientos son diferentes (las semillas embebidas en FSP presentan menor actividad aún), ambos tratamientos inhiben la actividad de la CAT con la misma tendencia. Por el contrario, la figura 17 muestra que la actividad de la SOD aumenta en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y aún más en las embebidas en la FSP. Estos resultados concuerdan con el estrés oxidante reportado (Romero-Romero et al. 2005), interesantemente, los efectos observados en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y en la FSP presentan tendencias similares, lo cual sugiere que el efecto fitotóxico de *S. deppei* se deba, en parte, a la presencia de proteínas de bajo peso molecular en su lixiviado acuoso. Nuevamente, las diferencias entre los resultados se atribuyen a las propiedades de los aleloquímicos empleados.

### **5.5. Enzima de degradación de carbohidratos de la pared celular**

Con lo que respecta a la actividad de las enzimas de degradación de carbohidratos de la pared celular, se ha reportado que su actividad es menor en el estrés aleloquímico causado por *S. deppei* (Lara-Núñez, et al. 2006). A fin de relacionar este efecto con la presencia de proteínas de bajo peso molecular en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, se comparó el efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* con el de la FSP obtenida sobre la actividad de la  $\beta - 1,3 -$  glucanasa. La figura 18 muestra que la actividad de esta enzima se inhibe significativamente en las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y en la FSP. En este caso no hay diferencias significativas en los efectos observados, por lo que se podría decir que el efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre las enzimas de degradación de carbohidratos del endospermo micropilar se debe a la presencia de proteínas de bajo peso molecular. La inhibición de esta enzima explica

también, el retraso en la germinación ya que al haber inhibición en el ablandamiento del endospermo micropilar, la protrusión radicular tomará más tiempo.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto el lixiviado acuoso de *S. deppei* como la FSP aislada afectan la actividad de las enzimas estudiadas; sin embargo, la razón por la cual se observan estos efectos queda por esclarecerse. A fin de explicar los efectos observados, se podría proponer un estudio *in vitro*, a través de cinéticas enzimáticas en contacto directo con el aleloquímico implicado en este estrés para evaluar si los cambios en las actividades se deben a fenómenos como inhibición (competitiva, no competitiva o alostérica), modificación covalente o activación proteolítica. Por otra parte, se podría estudiar la expresión de los genes que codifican para estas enzimas para evaluar si estos efectos son resultado de modificaciones durante la transcripción. El mecanismo de acción de las proteínas de bajo peso molecular presentes en el lixiviado acuoso de *S. deppei* también queda por esclarecerse; es necesario caracterizarlas y determinar si en esta fracción se encuentra un inhibidor de proteasas de serina, como se ha estado estudiando en el laboratorio de Alelopatía.

## **5.6. Permanencia del efecto alelopático de *S. deppei* en el suelo**

Ya que la gran mayoría de las interacciones alelopáticas se llevan a cabo en el suelo, es importante conocer cómo esta matriz puede afectar la biodisponibilidad de los aleloquímicos. A fin de comprobar que los efectos observados en el laboratorio son reproducibles en el campo, se procedió a analizar la fitotoxicidad del lixiviado acuoso de *S. deppei* cuando éste entra en contacto con la matriz de suelo. En la figura 19 se observa que el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa hasta un 50% de retraso en la germinación aún cuando éste se ha incubado por 72 horas en suelo no estéril, pero conserva su efecto si se incuba en suelo estéril. En la figura 20 se observa que el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa hasta un 50% de inhibición radicular aún cuando éste se ha incubado por 72 horas en suelo no

estéril, pero conserva su efecto si se incuba en suelo estéril. Los resultados obtenidos confirman la presencia de un inhibidor de proteasas de serina en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, evidentemente, de naturaleza proteica; las curvas de dosis-respuesta sugieren que la FSP tiene equivalencia tóxica con el lixiviado completo, además, en los ensayos enzimáticos se observa que los efectos de ambos tratamientos son similares. Los resultados de este último experimento indican que el aleloquímico responsable de la fitotoxicidad de *S. deppei* permanece en el suelo y por su naturaleza proteica, es susceptible únicamente a procesos de transformación y degradación microbiana.

## 6. CONCLUSIONES

El efecto fitotóxico del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre la germinación de *L. esculentum* comprende varios mecanismos fisiológicos: afecta el flujo de carbono generado durante el metabolismo central; al haber un desequilibrio durante la movilización de las reservas de las semillas no habrá un aporte suficiente de energía ni de los intermediarios necesarios para el funcionamiento de la plántula en desarrollo. *S. deppei* también causa un estrés oxidante al afectar la actividad de las enzimas encargadas de regular las concentraciones de ERO intracelulares, lo cual puede generar daño celular. Además inhibe las enzimas involucradas en el ablandamiento del endospermo micropilar, lo cual contribuye al retraso en la germinación y en la inhibición de la elongación radicular. Finalmente, las similitudes entre los resultados obtenidos para las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y las embebidas en la FSP sugieren, en parte, que el aleloquímico implicado en el estrés biótico que causa *S. deppei* sea la presencia de proteínas de bajo peso molecular en su lixiviado.

estéril, pero conserva su efecto si se incuba en suelo estéril. Los resultados obtenidos confirman la presencia de un inhibidor de proteasas de serina en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, evidentemente, de naturaleza proteica; las curvas de dosis-respuesta sugieren que la FSP tiene equivalencia tóxica con el lixiviado completo, además, en los ensayos enzimáticos se observa que los efectos de ambos tratamientos son similares. Los resultados de este último experimento indican que el aleloquímico responsable de la fitotoxicidad de *S. deppei* permanece en el suelo y por su naturaleza proteica, es susceptible únicamente a procesos de transformación y degradación microbiana.

## 6. CONCLUSIONES

El efecto fitotóxico del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre la germinación de *L. esculentum* comprende varios mecanismos fisiológicos: afecta el flujo de carbono generado durante el metabolismo central; al haber un desequilibrio durante la movilización de las reservas de las semillas no habrá un aporte suficiente de energía ni de los intermediarios necesarios para el funcionamiento de la plántula en desarrollo. *S. deppei* también causa un estrés oxidante al afectar la actividad de las enzimas encargadas de regular las concentraciones de ERO intracelulares, lo cual puede generar daño celular. Además inhibe las enzimas involucradas en el ablandamiento del endospermo micropilar, lo cual contribuye al retraso en la germinación y en la inhibición de la elongación radicular. Finalmente, las similitudes entre los resultados obtenidos para las semillas embebidas en el lixiviado acuoso de *S. deppei* y las embebidas en la FSP sugieren, en parte, que el aleloquímico implicado en el estrés biótico que causa *S. deppei* sea la presencia de proteínas de bajo peso molecular en su lixiviado.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Anaya, A.L. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. En: B.V. Conger (ed.). *Allelopathy. Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 697-739.

Anaya, A.L. 2003. Alelopatía. En: *Ecología Química*. Plaza y Valdés, S.A. de C.V. México, D.F. 255-299.

Antão, C.M. y Malcata, F. X. 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 637–650.

Bewley, J.D. y Black M. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. Segunda edición Nueva York, N.Y. Plenum. Pp. 1-31, 147- 195, 293-374.

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D. y Edelstein, S.J. (Eds.). 1996. Protein Methods. Segunda edición. Wiley-Liss. E.U. Pp. 62-67, 91-94, 107-129.

Bradford, M.R. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Cooper, T.G. y Beevers, H. 1969. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm: enzyme constituents and catalytic capacity. *Journal of Biological Chemistry* 244: 3507–3513.

Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L., Hernández, B.E. y Laguna, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of

Phaseolus vulgaris and Cucurbita ficifolia. *Journal of Chemical Ecology* 24 (12): 2039-2057.

Dakshini, K.M.M. Foy C.L. e Inderjit. 1999. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to Ecology. En Inderjit, Dakshini, K.M.M., Foy, CL. eds. *Principles and procedures in plant Ecology: Allelochemical interactions*. Boca Raton, Fl: CRC Press. Pp. 3-14.

Dixon, G. H. y Kornberh, G. L. 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochemical Journal* 72: 3.

Duke, S.O. y Lyndon, J. 1988. Herbicides from natural compounds. *Weed Technology* 2: 122.

Dunaevsky, Y.E., Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S. y Belozersky, M.A. 2005. Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance to Pathogens and Insects. *Molecular Biology* 39: 608-613.

Einhellig, F.A. 1985. Allelopathy - A natural protection, allelochemicals. En: *Handbook of Natural Pesticides: Methods. Volume I. Theory, Practice, and Detection*. Bhushan Mandava, N. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. Pp. 161-200.

Einhellig, F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal*. 88: 886-893.

Einhellig, F.A. 1999. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. En: *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemical Interactions*. Inderjit, Dakshini, K.M.M. y Foy, C.L. (eds.). CRC Press, New York. Pp. 217-238.

Einhellig, F.A. 2002. The physiology of allelochemical action: clues and views. En: Allelopathy from molecules to ecosystems. Reigosa, M, y Pedrol, N (eds). *Science Publishers, Inc. E.U.* Pp.1-23.

Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *Transley Review. New Phytologist* 171: 501-523.

Flores Martínez E. 2009. Efecto del estrés aleloquímico sobre el metabolismo central del carbono durante la germinación de semillas de *Lycopersicon esculentum*. Tesis. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Foy, C.L. e Inderjit. 2001. Understanding the role of allelopathy in weed interference and declining plant diversity. *Weed Technology*.15: 873-878.

Foyer, C. y Noctor, G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17: 7; ProQuest Medical Library: 1866.

Hale, M.G. y Orcutt, D.M. 1987. The physiology of plants under stress. John Wiley, N.Y. Pp. 206.

Hernández López I. 2005. Efecto del estrés hídrico sobre la actividad de hexocinasa en planta de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernández-Bautista, B.E., Torres-Barragán, A. y Anaya, A.L. 1996. Evidences of allelopathy in *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae). First World Congress on Allelopathy. Universidad de Cadiz. International Society of Allelopathy (IAS) P: 91.

Hider, R.C., Drake, A.F., Morrison, I.E.G., Kupryszewski, G. y Wilusz, T. 1987. Structure analysis of inhibitors isolated from Cucurbitaceae seeds – (Circular dichroism studies). *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 397–403.

Jiang M. y Zhang J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 53: 2401–2410.

Kowalska, J., Pszczoła, K., Wilimowska-Pelc, A., Lorenc-Kubis, I., Zuziak, E., Ługowski, M., Łęgowska, A., Kwiatkowska, A., Śleszyńska, M., Lesner, A., Walewska, A., Zabłotna, E., Rolka, K. y Wilusz, T. 2007. Trypsin inhibitors from the garden four o'clock (*Mirabilis jalapa*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seeds: Isolation, characterization and chemical synthesis. *Phytochemistry, Volume 68*, 11: 1487-1496.

Krishnamoorthi, R., Gong, Y. y Richardson, M. 1990. A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Curcubita maxima*) seeds. *FEBS Lett.* 273:163–167.

Kruger, N.J., Kombrink, E. y Beevers, H. 1983. Pyrophosphatefructose 6-phosphate phosphotransferase in germinating castor bean seedlings. *FEBS Lett* 153: 409-412.

Kruger, N.J. y Beevers, H. 1984. Effect of fructose 2,6-biphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose 1,6-biphosphatase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiology* 76: 49-54.

Lara-Núñez, A., Romero-Romero, T., Ventura, J.L., Blancas, V., Anaya, A.L. y Cruz-Ortega, R. 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and

oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Cell & Environment* 29: 2009-2016.

Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer. Germany, 506.

Laure, H.J., Faça, V. M., Izumi, C., Padovan, J.C. y Greene, L.J. 2006. Low molecular weight squash trypsin inhibitors from *Sechium edule* seeds. *Phytochemistry* 67 : 362–370

Lehninger, A.L. 2003. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Ediciones Omega, Barcelona. Pp. 427-471, 635-643.

Lira, R., Rodríguez-Jiménez, C., Alvarado, J.L., Rodríguez, I., Castrejón, J. y Domínguez-Mariani, A. 1998. Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botánica Mexicana* 42: 43-77.

Lira, R., Villaseñor, J.L. y Ortiz, E. 2002. A proposal for the conservation of the family Cucurbitaceae in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11: 1699–1720.

Mar, R.I., Carver, J.A., Sheil, M.M., Boschenok, J. Fu, S. y Shaw, D.C. 1996. Primary structure of trypsin inhibitors from *Sicyos australis*. *Phytochemistry*, Vol. 41, No. 5: 1265-1274.

Misra, H.P. y Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* 247, 3170– 3175.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science Vol.7 No.9.* 405-410.

Morohashi, Y. y Matsushima, H. 2000. Development of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany* 51: 1381-87.

Otlewski, J., 1990. The squash inhibitor family of serine proteinases. *Biological Chemistry*. Hoppe-Seyler 371 (Suppl.), 23–28.

Otlewski, J., 1993. The squash inhibitors of serine proteinases. En: Avile's, F.X. (Ed.), *Innovations in Proteases and their Inhibitors*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 369–388.

Putnam, A.R. y Tang, Ch-Sh. (Eds). 1986. The Science of Allelopathy. Wiley and Sons, New York. 317.

Reigosa, M.J., Pedrol, N., Sánchez-Moreiras, A.M. y González, L. 2002. Stress and allelopathy. In allelopathy from molecules to ecosystems. Eds. Reigosa MJ, Pedrol, N. *Science Publishers, Inc.* E.U. 231-256.

Romero-Romero, M.T. 2000. Efectos del estrés aleloquímico provocado por los metabolitos secundarios de plantas alelopáticas sobre el patrón de síntesis de proteínas de la raíz de *Cucurbita pepo* L. *Phaseolus vulgaris*, L. *Zea mays* L. y *Lycopersicon esculentum* L. Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Romero-Romero, M.T. 2003. Estudio comparativo entre el efecto del estrés aleloquímico y el estrés hídrico en las raíces de *Lycopersicon esculentum* L. (*Solanaceae*). Maestría en Ciencias Biológicas. Biología Experimental. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Romero-Romero, T., Sánchez-Nieto, S., Anaya, A.L. y Cruz-Ortega, R. 2005. Allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum*: a comparative study. *Plant Science* 168: 1059-1066.

Salyers, A.A., Palmer, J.K. y Wilkins, T.D. 1997. Laminarinase ( $\beta$ -glucanase) activity in Bacteroides from the human colon. *Applied Environmental Microbiology* 33: 1118-24.

Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1: 1: 16-22.

Schaller, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197.

Scopes, R.K. 1982. Protein Purification. Principles and Practice. Springer-Verlag, New York. Pp. 76-85.

Taiz, L. y Zeiger, E. (Eds). 2003. Plant Physiology. Tercera edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers, E.U. Pp. 340-348.

Tharayil, N., Bhowmik, P.C. y Xing, B. 2008. Bioavailability of Allelochemicals As Affected by Companion Compounds in Soil Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 3706-3713.

Tukey, H. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *Botanical Review*. 35: 1-16.

Turner, W.L., Knowles, V.L. y Plaxton, W.C. 2005. Cytosolic pyruvate kinase: subunit composition, activity, and amount in developing castor and soybean seeds, and biochemical characterization of the purified castor seed enzyme. *Planta* 222: 1051-1062.

Villaseñor, J.L. y Espinosa, F.J. 1998. Catálogo de malezas de México. Ediciones Científicas Universitarias. Serie Texto Científico Universitario. Universidad Nacional Autónoma de México.

Waller, G.R. (Ed.). 1987. Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. American Chemical Society Symposium Series 330. Washington, D.C. Pp. xi-xviii.

Weir, T.L., Park, S-W. y Vivanco, J.M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 472-479.

Wieczorek, M., Otlewski, J., Cook, J., Parks, K., Lulek, J., Wilimowska-Pelc, A., Polanowski, A., Wilusz, T. y Laskowski Jr., M., 1985. The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 126: 646–652.