



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL ESTRES ALELOQUIMICO  
PROVOCADO POR LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE PLANTAS ALELOPATICAS  
SOBRE EL PATRON DE SINTESIS DE PROTEINAS  
DE LA RAIZ DE *Cucurbita pepo L.*, *Phaseolus  
vulgaris L.*, *Zea mays L.* Y *Lycopersicon esculentum L.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A  
MARIA TERESA ROMERO ROMERO



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

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE TESIS  
2000

278302



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
**Efecto del estrés aleloquímico provocado por 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.**

realizado por: **María Teresa Romero Romero**

Con número de cuenta: **8629536-1**, pasante de la carrera de: **BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis: **Dra. Ana Luisa Anaya Lang**  
Propietario

Propietario: **Dra. Rocío Cruz Ortega**

Propietario: **Dra. Patricia Tato Zaldivar**

Suplente: **Dra. Alma Orozco Segovia**

Suplente: **Dra. Patricia Guevara Fefer**

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.



Consejo Departamental de Biología

**DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ**

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

**Efecto 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.**

## DEDICATORIAS

- Este trabajo se lo dedico a mi gran amigo, JESÚCRISTO por haberme permitido alcanzar esta gran meta de mi vida, así como todo lo que me ha brindado (amor, comprensión, esperanza, fe, fuerza, felicidad y libertad así como probadas de malos sentimientos para valorar los primeros) y espero que yo nunca lo defraude como ser humano.
- A mis padres por su amor, confianza, respeto, libertad y su buen ejemplo que siempre me han dado.
- A mi hermano que es uno de los regalos más grandes que he recibido de Dios.
- A toda mi familia: abuelos (as), tíos (as), primos (as) por brindarme su cariño y apoyo.
- A Ramón por el cariño que me brinda y porque se ha convertido en una parte importante de mi vida.
- A mis grandes amigos: América, Angélica, Rosy, Nora, Carmen, Pilar, Adelaida Fidel, Gumercindo, Jesús, Israel, Víctor y a todos mis compañeros de la carrera por su gran y maravillosa amistad.

## AGRADECIMIENTOS

- Mis mas sinceros agradecimientos y admiración a las Doctoras Ana Luisa Anaya Lang y Rocío Cruz Ortega por toda su confianza y apoyo brindados en cada momento de mi formación profesional así como por sus enseñanzas y profesionalismo al dirigir y asesorar el presente trabajo. Y por ser las mejores personas que he conocido en mi vida.
- A Blanca E. Hernández y a la próxima Dra. Andrés Torres por su gran amistad y por toda la ayuda que me brindaron para la elaboración de este trabajo.
- A mis compañeros de laboratorio Antonia, Gabriela y Aurora por su apoyo y amistad.
- A las Doctoras. Patricia Tato Zaldivar, Alma Orozco Segovia y Patricia Guevara Fefer por la revisión y opiniones hechas al presente trabajo.
- A mis compañeros del laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología especialmente a Angélica y Alfredo por sus opiniones sobre el presente trabajo así como por su gran amistad.

- A la Sra. Guadalupe por su linda amistad y por su gran e importante desempeño en el laboratorio
- A Ember y Miriam por las facilidades prestadas para el uso del scan y la computadora.
- Este trabajo se realizó en el laboratorio de Ecología Química del Instituto de Fisiología Celular con el apoyo económico del proyecto 400346-5-25316N del CONACYT y del proyecto IN-217796 de la DGAPA.

# CONTENIDO

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
ESTRÉS BIOLÓGICO	4
CONCEPTO Y TIPOS DE ESTRÉS BIOLÓGICO	4
ALELOPATÍA	5
CONCEPTO	5
BIOSÍNTESIS Y NATURALEZA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS	6
VÍAS DE LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS	7
REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS	8
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS	9
CRECIMIENTO Y DIVISIÓN CELULAR	9
INTERACCIÓN CON HORMONAS	10
ENZIMAS	10
RESPIRACIÓN	11
FOTOSÍNTESIS	11
RELACIONES HÍDRICAS	11
PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA	12
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	12
PROTEÍNAS DE ESTRÉS	13
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
METODOLOGÍA	16
MATERIAL BIOLÓGICO	16
BIOENSAYOS <i>IN VITRO</i>	16
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	17
ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES	18
ANÁLISIS DE GELES CON EL ESCÁN GSXL	19
RESULTADOS	20
<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	20
<i>ZEA MAYS</i>	33
<i>CUCURBITA PEPO</i>	45
<i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i>	56
HERBICIDA 'ALACLOR'	70
DISCUSIÓN	71
BIBLIOGRAFÍA	74



## RESUMEN

El presente trabajo se enfocó al estudio del estrés aleloquímico causado por las plantas alelopáticas: *Sicyos deppei*, *Acacia cedilloi*, *Sebastiania adenophora* y *Lantana* sp., sobre el crecimiento radicular y el patrón de proteínas citoplásmicas de *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, *Cucurbita pepo* y *Licopersicon esculentum*. Paralelamente se analizó el efecto del herbicida 'Alaclor' sobre la raíz de estas mismas plantas. Se realizaron bioensayos con los lixiviados acuosos de las hojas secas de las plantas alelopáticas, incorporados en agar sobre el cual se pusieron a germinar las semillas de las plantas cultivadas. Se extrajeron las proteínas citoplásmicas de las raíces, las cuales se corrieron en geles de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE), y se analizaron por densitometría de láser en un escán GS-XL 2.1. Se determinó el peso molecular relativo de las proteínas significativamente alteradas. La mayoría de los lixiviados acuosos de las plantas alelopáticas alteraron el patrón de proteínas citoplásmicas de las raíces de las plantas cultivadas. Los resultados mostraron que los lixiviados acuosos modificaron de forma diversa la expresión de ciertas proteínas de diferentes pesos moleculares. De éstas, destacan: una proteína nueva en la raíz de frijol tratada con el lixiviado de *Lantana*, dos desaparecidas en maíz con el tratamiento de *Acacia* y tres que aparecieron con *Sebastiania*; en la raíz de calabaza desaparecieron tres con el tratamiento de *Sicyos* y dos con *Lantana*, y en la raíz de jitomate, desaparecieron tres, una con *Sicyos*, una con *Acacia* y una con *Sebastiania*, además de que apareció una con el tratamiento con *Acacia*. El herbicida 'Alaclor' afectó el patrón de proteínas de frijol levemente y de jitomate muy significativamente, pero de modo distinto al de los lixiviados. Se concluye que el estrés aleloquímico es específico en cuanto a su acción sobre el patrón de proteínas, dependiendo de la especie donadora de estos compuestos, y de la receptora, la cual tiene una forma particular de respuesta a este tipo de estrés.

# INTRODUCCIÓN

## ESTRÉS BIOLÓGICO

### CONCEPTO Y TIPOS DE ESTRÉS BIOLÓGICO

El significado literal de la palabra "estrés", derivado del latín: *stringere*, significa restricción o fuerza impulsiva. Biológicamente el estrés es considerado como una alteración de las condiciones óptimas de vida, la cual produce cambios y respuestas en todos los niveles funcionales (bioquímicos y fisiológicos) de las plantas y en general de todos los organismos. Las condiciones adversas del medio, que no necesariamente son letales y que ocurren permanente o esporádicamente en una localidad, son generalmente conocidas como "estrés" (Larcher, 1995). Si las plantas son expuestas por un periodo de tiempo largo a condiciones severas de "estrés", éstas condiciones pueden causarles la muerte (Levitt, 1972).

Los factores adversos del medio pueden ser abióticos y bióticos. Los factores abióticos que pueden causar estrés son: la radiación, la temperatura, la sequía, inundaciones, deficiencia de nutrimentos o toxicidad por exceso de éstos, salinidad, acidez y fuertes vientos. Dentro de los factores bióticos encontramos a una alta densidad poblacional, competencia, parásitos y patógenos (insectos, diversos microorganismos, nemátodos), herbívoros e interacciones alelopáticas negativas. También existe el estrés por causas antropogénicas, como la contaminación (plaguicidas y fertilizantes), los incendios y los desechos industriales, entre muchos otros (Larcher, 1995) (Tabla 1).

Tabla 1. Factores abióticos y bióticos que causan estrés en el medio (Larcher, 1995).

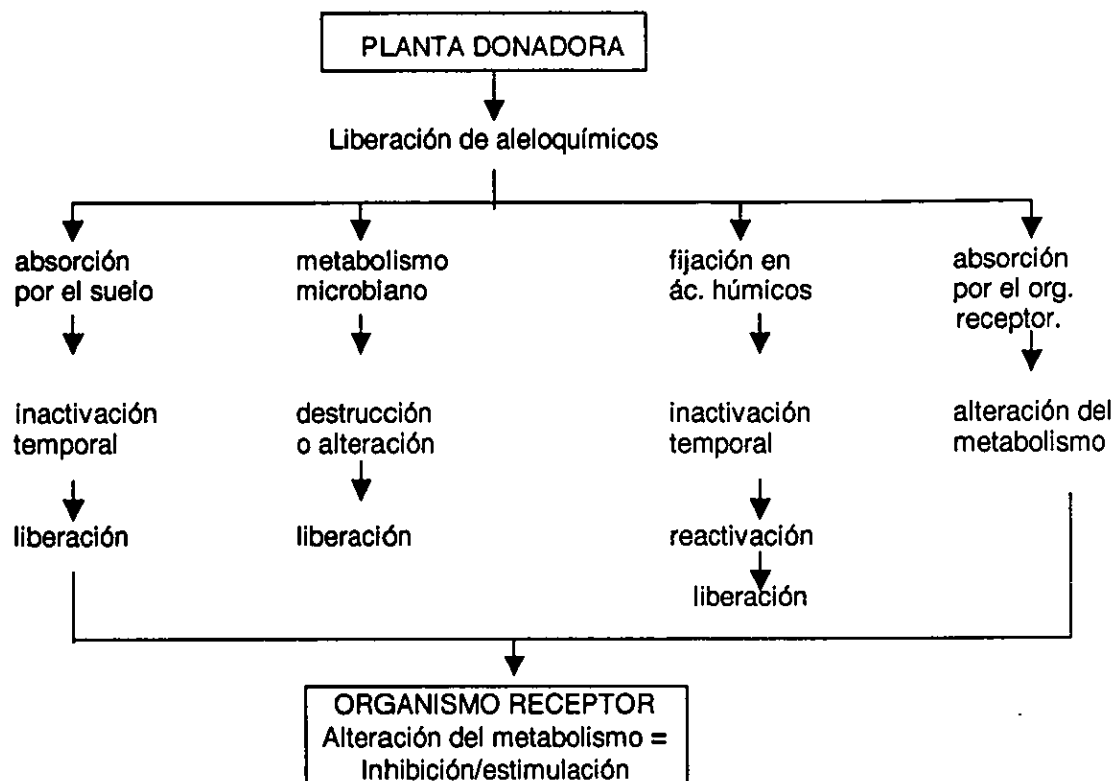
FACTORES DE ESTRÉS	
Abióticos	Bióticos
Factores atmosféricos: viento, radiación UV	Sobrepoblación, competencia
Temperatura: calor, frío	Herbivoría
Agua: déficit, exceso	Patógenos (microorganismos diversos) y parásitos
Deficiencia y exceso de nutrimentos. (N <sub>2</sub> , P, Mn.)	Daño por pisoteo de animales
Acidez y alcalinidad del suelo: toxicidad por Al, Hg, Cd, Cu.	Contaminación (plaguicidas y fertilizantes)
Salinidad del suelo	Alelopatía (fenoles, alcaloides, terpenos, etc.)
Efectos mecánicos (viento)	Daño por incendios

## ALELOPATÍA

### CONCEPTO DE ALELOPATÍA

Como se mencionó anteriormente, las plantas están sometidas a la influencia de diversos factores del medio, los cuales pueden afectar su metabolismo, y por lo tanto, su crecimiento y desarrollo. Dentro de los factores bióticos de estrés, se encuentra la alelopatía. La palabra **alelopatía** deriva de dos raíces griegas: *allelon*= recíproco y *pathos*= sufrimiento, literalmente significa el efecto perjudicial entre dos organismos. En la reunión internacional de Alelopatía celebrada en 1996, se definió a ésta como *'cualquier proceso que involucre la producción de metabolitos secundarios por plantas, y microorganismos, los cuales influyen en el crecimiento y desarrollo de otros organismos (excluyendo a los animales) en ecosistemas naturales y agroecosistemas* (Resúmenes del First World Congress on Allelopathy 1996).

El fenómeno de la alelopatía es complejo y en él están involucrados muy diversos componentes, entre los cuales tenemos: (1) la planta productora de los compuestos químicos (aleloquímicos), que en su mayoría son metabolitos secundarios, (2) las condiciones ambientales entre las cuales se consideran a los microorganismos que se puedan encontrar en el suelo, 3) el edafosistema, de por sí sumamente complejo, u otro substrato distinto, incluyendo el agua en los sistemas acuáticos, y (3) las plantas o microorganismos receptores de los aleloquímicos (Horsley, 1976).



**Figura 1.** Componentes involucrados en el fenómeno de la alelopatía. La composición y/o estructura química de un aleloquímico liberado al medio, puede ser alterada o modificada de diversas formas al ir de la planta donadora al organismo receptor, en donde puede ocasionar una alteración metabólica que se va a reflejar en una inhibición o estimulación de su crecimiento (modificado de Horsley, 1976).

### **BIOSÍNTESIS Y NATURALEZA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS**

Los metabolitos secundarios implicados en la alelopatía, pertenecen a diversos grupos químicos; la mayoría provienen de la vía del acetato o del ácido shikímico (Rice, 1984). Los derivados del acetato son los terpenos, los esteroides, los flavonoides solubles en agua, los ácidos con cadenas de alcoholes, los aldehídos alifáticos, las acetonas, los ácidos grasos insaturados los poliacetilenos, las naftoquinonas, las antraquinonas, las quinonas y el floroglucinol.

Los aleloquímicos derivados de la vía biosintética del ácido shikímico incluyen los fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, las cumarinas, los glucósidos, los alcaloides y las cianohidrinias, algunos derivados de las quinonas y taninos hidrolizables y condensados. Las rutas biosintéticas de varios compuestos fenólicos (los cuales incluyen muchos de los derivados del ácido benzoico y del cinámico) se han estudiado extensamente, y se han aislado y purificado varias enzimas involucradas en las rutas biosintéticas de estos compuestos (Bolwell et. al., 1986; Liang et. al., 1989).

Se calcula que aproximadamente el 2% del carbón fotosintético es empleado para la biosíntesis de varios flavonoides y componentes fenólicos. La concentración de estos componentes en los tejidos varía de acuerdo a la tasa de biosíntesis, almacenamiento y degradación y al balance interno de los reguladores del crecimiento de las plantas (Harborne, 1980).

### **VÍAS DE LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS**

Las rutas de liberación de los aleloquímicos al medio dependen de: 1) su naturaleza química, 2) el lugar donde se almacenan en las células, y 3) su unión con otras moléculas (Gershenzon, 1993). Los aleloquímicos pueden ser tóxicos para la misma planta que los produce, por lo que éstas han desarrollado diversos mecanismos o estrategias para mantenerlos alejados de los sitios donde se efectúan reacciones metabólicas. Por ejemplo, los pueden inactivar, combinándolos con diversos radicales, como los azúcares, y/o formando polímeros; pueden ser almacenados en las vacuolas, depositados en células muertas (duramen de la madera), en espacios intercelulares, en pelos glandulares, o bien ser descargados al exterior (Rice, 1984).

De acuerdo con Tukey (1969), existen cuatro rutas de liberación de los aleloquímicos, las cuales son:

1. Volatilización
2. Lixiviación
3. Exudación por las raíces
4. Descomposición de los residuos de la planta (Mandava, 1985; Narwal, 1994; Rice, 1984).

**Volatilización.** La liberación de los aleloquímicos por volatilización está siempre relacionada con las plantas que producen terpenos ( $\alpha$  y  $\beta$  pineno, alcanfor, entre otros) (Fischer, et. al., 1994). Por ejemplo, los terpenos de *Eucalyptus* son tóxicos para la germinación y el crecimiento de numerosos cultivos (Del Moral y Muller, 1970). La toxicidad de los aleloquímicos volátiles es prolongada, debido a su adsorción en las partículas del suelo, por lo que pueden permanecer en éste durante varios meses.

**Lixiviación.** Es la liberación de los aleloquímicos de la planta por la acción de la lluvia, la nieve, la niebla, el rocío o la llovizna. Esta lixiviación determina que una gran cantidad de aleloquímicos llegue al medio (Devi, et. al., 1996). El grado de lixiviación, sin embargo, depende del tejido, de la edad de la planta y de la cantidad de la precipitación (Molina, et. al., 1991). Entre los aleloquímicos liberados por la lixiviación podemos citar una gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas, tales como compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides (Rice, 1984); muchos de estos aleloquímicos están bien caracterizados por sus efectos tóxicos sobre las plantas circundantes o

receptoras y los microorganismos, tanto en condiciones de campo, como en el laboratorio (Macias, et. al., 1994).

**Exudación por la raíz.** En varias circunstancias, la reducción de la producción de los cultivos se ha atribuido a toxinas liberadas por las raíces de varias plantas, tanto cultivadas como malezas (Alsaadawi, et. al., 1985). Varios de los compuestos liberados por la exudación de las raíces son conocidos por sus efectos inhibidores sobre la germinación, el crecimiento de las raíces y brotes, la absorción de nutrimentos y la nodulación (Yu y Matsui, 1994). Se ha observado que factores tales como la edad de la planta, la nutrición, la luz y la humedad influyen, cualitativa y cuantitativamente, sobre la exudación de compuestos químicos por la raíz (Einhellig, 1987).

**Descomposición de los residuos vegetales.** La descomposición de los residuos vegetales proporciona una gran cantidad de aleloquímicos a la rizósfera (Devi, et. al., 1996). Los factores que influyen en este proceso, dependen de la naturaleza de los residuos, del tipo de suelo y de las condiciones ambientales (Mason-Sedum, et al., 1986). Los compuestos liberados al suelo pueden ser transformados por la microflora en productos biológicamente más activos que los compuestos originales (Blum y Shafer, 1988).

#### **REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS**

La síntesis, la liberación y la toxicidad de los aleloquímicos en el medio están influenciadas por varios factores abióticos (Berg, 1986). Entre estos factores, la luz juega un papel importante en la síntesis de los aleloquímicos (Koeppel, et. al., 1976). Por otro lado, las altas temperaturas pueden aumentar el efecto biológico de estos compuestos (Einhellig y Ecrich, 1984), pero al contrario de la luz influyen más en su tasa de liberación que en su síntesis. Por ejemplo, Steinseik y colaboradores (1982) observaron que los lixiviados de trigo causan una mayor inhibición en la germinación y crecimiento de *Ipomoea heredacea* a 35°C que a 30° o a 25°C.

Otro factor es la textura del suelo, que también influye en la toxicidad de los aleloquímicos. La mayoría de los aleloquímicos volátiles adsorbidos por las partículas coloidales del suelo, permanecen en forma activa por periodos prolongados (Muller y del Moral, 1966). Por otro lado, la toxicidad de los compuestos fenólicos presentes en el suelo, está influenciada principalmente por la aireación del suelo y las prácticas de labranza. La aireación determina el tipo de productos formados, su acumulación y su persistencia. Bajo condiciones aeróbicas, la descomposición de los compuestos orgánicos por los microorganismos es muy rápida, mientras que en condiciones anaeróbicas se favorece la producción de compuestos como el metano, etileno, los ácidos acético, láctico y butírico y varios compuestos fenólicos, los cuales se ha demostrado que tienen efectos tóxicos (Chou y Chiou, 1979; Chou et. al., 1977). El oxígeno no solo actúa determinando el tipo de compuestos formados durante

la descomposición de los residuos vegetales, sino que también puede afectar su actividad, su concentración y su persistencia en el suelo (Devi, et. al., 1996).

Por otro lado, se ha observado que hay una inhibición de la absorción de nutrientes cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés aleloquímico (Blum, et. al., 1992). Glass (1976), Stowe y Osborne (1980), observaron que los efectos de los aleloquímicos disminuyen con el aumento en los niveles de nutrientes. Sin embargo, Bhowmik y Doll (1984), demostraron que aún con altos niveles de nitrógeno y fósforo no se disminuyó el potencial alelopático de cinco malezas anuales.

Por otro lado, el pH del suelo también influye en la liberación de los aleloquímicos, debido a la modificación que éstos sufren por los microorganismos que descomponen los residuos vegetales en el suelo. En suelos ácidos se reduce la descomposición de los residuos y, por lo tanto, disminuye la liberación de aleloquímicos (Berg, 1986; Berg y Agren, 1984).

También se ha visto que el estrés hídrico puede incrementar el efecto de los aleloquímicos. Por ejemplo, Einhellig (1987) estudió el efecto de dos concentraciones de ácido ferúlico (0.1 Y 0.25 mM) sobre plántulas de *Shorgum*, tanto en forma individual como combinada con estrés hídrico (-0.2MPa), y observó que el ácido ferúlico no causó ningún efecto sobre el crecimiento de *Shorgum*, pero en combinación con el estrés hídrico, el crecimiento se ve significativamente reducido.

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS

Los efectos visibles que provocan los aleloquímicos sobre la germinación y/o crecimiento de las plantas receptoras, son solo la manifestación de los efectos primarios que ocurren a nivel celular (Rizvi y Rizvi 1992).

Aunque ha habido muchas evidencias documentadas sobre la inhibición del crecimiento causada por los aleloquímicos, la respuesta fisiológica y los mecanismos moleculares desencadenados por estos compuestos no han sido lo suficientemente investigados.

Son varios los procesos metabólicos que pueden ser afectados por los aleloquímicos en la planta receptora. A continuación se describen los más importantes de estos procesos.

### ***Crecimiento y división celular***

Muchos aleloquímicos afectan el crecimiento de varias especies de malezas y cultivos, inhibiendo el crecimiento de las raíces y los brotes, y produciendo, además una reducción en la expansión foliar, y finalmente un marchitamiento en las plantas (Einhellig et. al., 1985; Holappa y Blum, 1991, Klein y Blum, 1990).

la descomposición de los residuos vegetales, sino que también puede afectar su actividad, su concentración y su persistencia en el suelo (Devi, et. al., 1996).

Por otro lado, se ha observado que hay una inhibición de la absorción de nutrientes cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés aleloquímico (Blum, et. al., 1992). Glass (1976), Stowe y Osborne (1980), observaron que los efectos de los aleloquímicos disminuyen con el aumento en los niveles de nutrientes. Sin embargo, Bhowmik y Doll (1984), demostraron que aún con altos niveles de nitrógeno y fósforo no se disminuyó el potencial alelopático de cinco malezas anuales.

Por otro lado, el pH del suelo también influye en la liberación de los aleloquímicos, debido a la modificación que éstos sufren por los microorganismos que descomponen los residuos vegetales en el suelo. En suelos ácidos se reduce la descomposición de los residuos y, por lo tanto, disminuye la liberación de aleloquímicos (Berg, 1986; Berg y Agren, 1984).

También se ha visto que el estrés hídrico puede incrementar el efecto de los aleloquímicos. Por ejemplo, Einhellig (1987) estudió el efecto de dos concentraciones de ácido ferúlico (0.1 Y 0.25 mM) sobre plántulas de *Shorgum*, tanto en forma individual como combinada con estrés hídrico (-0.2MPa), y observó que el ácido ferúlico no causó ningún efecto sobre el crecimiento de *Shorgum*, pero en combinación con el estrés hídrico, el crecimiento se ve significativamente reducido.

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALELOQUÍMICOS

Los efectos visibles que provocan los aleloquímicos sobre la germinación y/o crecimiento de las plantas receptoras, son solo la manifestación de los efectos primarios que ocurren a nivel celular (Rizvi y Rizvi 1992).

Aunque ha habido muchas evidencias documentadas sobre la inhibición del crecimiento causada por los aleloquímicos, la respuesta fisiológica y los mecanismos moleculares desencadenados por estos compuestos no han sido lo suficientemente investigados.

Son varios los procesos metabólicos que pueden ser afectados por los aleloquímicos en la planta receptora. A continuación se describen los más importantes de estos procesos.

### ***Crecimiento y división celular***

Muchos aleloquímicos afectan el crecimiento de varias especies de malezas y cultivos, inhibiendo el crecimiento de las raíces y los brotes, y produciendo, además una reducción en la expansión foliar, y finalmente un marchitamiento en las plantas (Einhellig et. al., 1985; Holappa y Blum, 1991, Klein y Blum, 1990).



La inhibición del crecimiento radicular se debe, entre otros procesos, a una alteración de la división celular. Cruz-Ortega y colaboradores (1988) observaron que el extracto etanólico del pólen de maíz actúa como un inhibidor de la mitosis en células meristemáticas de raíces de sandía (50 % de inhibición del índice mitótico). Por otra parte, Anaya y Pelayo-Benavides (1991) observaron que el lixiviado acuoso de *Mirabilis jalapa* inhibió un 31% la mitosis en los meristemas de la raíz de plántulas de chícharo.

### **Interacción con hormonas.**

Se ha reportado que una variedad de aleloquímicos altera los niveles del ácido Indolacético (IAA) mediante la inhibición de la enzima ácido indolacético oxidasa, la cual actúa directamente sobre el precursor del IAA. En plántulas de avena y chícharo tratadas con ácido ferúlico, se observó una disminución en la concentración del IAA (Devi, et. al., 1996). Dependiendo de su acción sobre el IAA, muchos de los compuestos fenólicos fueron divididos en dos grupos por Lee y colaboradores (1980). En el primer grupo se encuentran aquellos compuestos que promueven la destrucción del IAA, como los ácidos p-cumárico, hidroxibenzoico, vainíllico, siríngico y florético; en el segundo grupo están incluidos los compuestos fenólicos que inhiben la destrucción del IAA, como son los ácidos clorogénico, cafeíco, ferúlico, y protocatéquico.

Los compuestos fenólicos, pueden interactuar además, con el ácido giberélico (GA), ya sea uniéndose a la molécula o inhibiendo su proceso de síntesis. Rasmussen y Einhellig (1979) observaron una inhibición de la germinación en semillas de *Shorgum* tratadas con los ácidos ferúlico, p-cumárico y vainíllico. Diversos taninos inhiben el crecimiento inducido por el GA, por medio de la reducción de la actividad de la amilasa y de la síntesis de la fosfatasa en el endospermo de las semillas de cebada (Jacobsen y Corcoran, 1977). Por otro lado, la inhibición del crecimiento del pepino causada por el ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos, ha sido relacionada con el aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA) (Holappa y Blum, 1991; Li et. al., 1993).

### **ENZIMAS**

Muchos de los aleloquímicos pueden modificar la síntesis y /o la actividad de varias enzimas tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue inhibida por el ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos (Hoover, et. al., 1977). Los aleloquímicos regulan la actividad de las enzimas, a bajas concentraciones, pueden aumentarla y a altas concentraciones, inhibirla. Devi y Prasad (1992) reportaron que el ácido ferúlico inhibió la actividad de las enzimas hidrolíticas: amilasa, maltasa, invertasa, proteasa y fosfatasa en semillas de maíz. Estas enzimas están involucradas en la movilización de las sustancias de reserva. Los autores atribuyeron la inhibición del crecimiento a los efectos del ácido ferúlico sobre éstas enzimas. Por otro lado, este ácido aumenta la actividad de las enzimas oxidativas, como la peroxidasa, la catalasa y la ácido indolacético oxidasa en plántulas de maíz (Devi y Prasad, 1996). Tal incremento es acompañado por un considerable

aumento en las enzimas que actúan sobre la síntesis de los fenilpropanoides como la fenilalanina amonilasa (PAL) y la cinamil alcohol deshidrogenasa.

### **RESPIRACIÓN**

Los aleloquímicos inhiben o alteran la respiración dependiendo de su naturaleza química, de su concentración y de la edad de la planta. Van Sumere y colaboradores (1971) demostraron que la juglona (1mM) inhibió la respiración en células de levadura, desacoplando la fosforilación oxidativa e inhibiendo el flujo de electrones al oxígeno. Mas adelante Ravanel (1986) observó la capacidad de las flavonas y flavonoles para desacoplar la fosforilación oxidativa de mitocondrias aisladas de papas y frijoles. Cruz-Ortega y colaboradores (1988) observaron que el extracto etanólico del polen de maíz actuó como un inhibidor del transporte de electrones, disminuyendo el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de sandía. Rasmussen y colaboradores (1992) demostraron que la sorgoleona (0.5  $\mu$ M), aleloquímico exudado por las raíces de *Sorghum bicolor*, es un poderoso inhibidor de la respiración en mitocondrias aisladas de soya (*Glycine max*) y maíz (*Zea mays*), bloqueando el flujo de electrones al oxígeno, entre el citocromo b y el complejo c<sub>1</sub>. Por otra parte, Hejl y colaboradores (1993) observaron la capacidad de la juglona para alterar las funciones normales de la mitocondria, actuando como un desacoplante en el sistema de transporte de electrones durante la producción de ATP en mitocondrias aisladas de *Glycine max*.

### **FOTOSÍNTESIS**

La inhibición del crecimiento, y por lo tanto la reducción en el peso seco, debida al efecto del estrés aleloquímico, pueden estar relacionados con un efecto sobre el proceso de la fotosíntesis. Blum y Rebeck (1989) observaron una considerable reducción en la tasa fotosintética y contenido clorofílico en plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico. En cloroplastos aislados se observó que éste ácido inhibió el transporte de electrones. En general se ha demostrado que varios aleloquímicos inhiben la fijación del CO<sub>2</sub> y la fosforilación oxidativa, ésta última a través de la inhibición de las ATPasas de la membrana del cloroplasto (Devi, et al., 1996). En otro estudio, Calera y colaboradores (1995 a,b y 1996) observaron que la isoalloalantolactona aislada de *Ratibida mexicana*, inhibió la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinaca, alterando el flujo de protones y el transporte de electrones en el fotosistema II (P680). El estudio del efecto de los aleloquímicos sobre el proceso de fotosíntesis, es un aspecto importante a considerar debido al potencial herbicida que algunos aleloquímicos pueden tener (Devi, et al., 1996).

### **RELACIONES HÍDRICAS**

La absorción del agua, esencial, entre otros muchos procesos, para mantener la turgencia en las células, es también afectada por un gran número de aleloquímicos. Se ha demostrado que en plantas de soya, pepino, jitomate y *Sorghum*, el potencial hídrico de las hojas disminuye por efecto de los ácidos

ferúlico, p-cumárico, gálico y por la cafeína (Blum y Dalton, 1985). Sin embargo, Klein y Blum (1990) no observaron ningún cambio en el potencial hídrico del frijol, lo que sugiere que existe una diferencia de sensibilidad en las plantas a los aleloquímicos. Einhellig y colaboradores (1985) sugirieron que la inhibición de la conductancia estomatal, de la transpiración y de la expansión de las hojas, causada por varios aleloquímicos, se debía a la reducción del potencial hídrico.

### **PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA**

Los compuestos fenólicos, como el flavonol y los flavonoides, pueden alterar las propiedades de la membrana causando una despolarización e interfiriendo con la actividad de las ATPasas, lo que produce un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa, la cual provee la energía necesaria para las funciones celulares (Moreland y Novitzky, 1987). El diacetil-piquerol, aislado de *Piqueria trinervia*, inhibió la actividad de la H<sup>+</sup> ATPasa de microsomas de células de raíces de *Ipomoea purpurea*. La H<sup>+</sup> ATPasa de la membrana plasmática fue inhibida un 67.2% y la ATPasa del tonoplasto un 31.6% (Cruz-Ortega, et. al., 1990). Así la interferencia de aleloquímicos con la síntesis de ATP o su disponibilidad para varios procesos de transporte, pueden alterar las funciones de la membrana y por lo tanto el metabolismo de la planta.

### **SÍNTESIS DE PROTEÍNAS**

Van Sumere y colaboradores (1971) investigaron los efectos de muchos agentes alelopáticos, sobre la incorporación de fenilalanina marcada con <sup>14</sup>C a proteínas de levaduras, semillas y embriones de cebada y lechuga. Los autores mencionan que los agentes aleloquímicos disminuyeron significativamente la incorporación de este aminoácido en todos los casos y concluyeron que algunos agentes alelopáticos, pueden reducir el crecimiento por la inhibición del transporte de los aminoácidos y consecuentemente de la síntesis de proteínas.

Baziramakenga y colaboradores (1997) observaron que los ácidos benzoico, vainillico, cinámico, y ferúlico, a 250 μM, disminuyeron la incorporación de <sup>32</sup>P a los ácidos nucleicos, así como también la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina a las proteínas en raíces de plántulas de soya (*Glycine max*); por el contrario, los ácidos p-hidroxybenzoico y p-cumárico aumentaron su incorporación. Sin embargo, a una concentración de 125 μM la mayoría de estos compuestos, excepto los ácidos benzoico y cinámico, aumentaron la incorporación de <sup>32</sup>P al DNA y al RNA, aunque los ácidos vainillico, cinámico y ferúlico disminuyeron la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina a las proteínas. Los autores concluyeron que la interferencia de los ácidos fenólicos con los ácidos nucleicos y el metabolismo de las proteínas, es uno de los muchos mecanismos por los cuales estos ácidos pueden interferir para afectar el crecimiento de las plántulas de soya.

## PROTEÍNAS DE ESTRÉS

La respuesta de las plantas a los diferentes factores que causan un estrés ambiental depende de su 'sensibilidad' o 'tolerancia', la cual está determinada, entre otras cosas, por sus características genéticas. Se ha demostrado que varios factores ambientales que causan un estrés inducen cambios en la expresión de genes, los cuales se reflejan en el aumento o disminución de ciertos metabolitos, o bien en la actividad de enzimas o en la síntesis de proteínas nuevas, las cuales pueden ser específicas para un tipo de estrés en particular (Ziegler, 1990).

Los cambios en el patrón de proteínas en los organismos sometidos a diferentes tipos de estrés, se han podido analizar gracias a la técnica de electroforesis, en particular, la técnica de dos dimensiones (2D-PAGE) que separa y detecta polipéptidos individuales (entre 1000 y 2000 proteínas) (García Olmedo, 1988; Hurkman, 1990). Con esta técnica, se han identificado proteínas que han sido inducidas o alteradas durante diferentes condiciones de estrés: hídrico y salino (Ericson, 1984; Hurkman y Tanaka, 1991; Singh, 1987; Ben-Hayyim, 1989), de estrés por temperatura alta (Key et. al., 1981; Vierling, 1991; Sabehat, et al., 1998), por frío (Antikainen y Griffith, 1997; Tomashow, 1999), por anaerobiosis (Moons, et al., 1998; Chang, et al., 2000), toxicidad por metales (Ownby y Hruschka, 1991; Cruz-Ortega y Ownby, 1993) y por patógenos (Linthorst, 1991; Van Loon y Van Strien, 1999). Por ejemplo, se identificó una proteína nueva de 26 kD, la osmotina, en células de tabaco sometidas a estrés osmótico (Singh et al., 1987). Los autores sugirieron que la osmotina puede ayudar en el ajuste osmótico de la célula durante períodos de estrés hídrico y/o salino. Sin embargo, posteriormente, la osmotina se identificó como una proteína de patogenicidad (PR), con actividad antifúngica (Abad, et. al., 1996).

Otro ejemplo, es el caso del estrés por temperatura, las plantas al igual que otros organismos, al ser expuestas a temperaturas mayores a las de sus límites normales, inducen la síntesis de un amplio rango de proteínas, llamadas de estrés térmico (en inglés heat shock proteins ó HSPs). Estas proteínas de estrés térmico se han identificado en varias especies vegetales como el frijol y el tabaco (Key, et.al., 1981), el maíz y el trigo (Vierling, 1991). Diversos estudios han mostrado que las HSPs pueden ayudar a la termotolerancia de las plantas (Kee y Nobel, 1986; Sabehat, et al., 1998). Otra función importante de éstas proteínas, es la de servir como 'proteínas chaperonas', las cuales se sabe ayudan al plegamiento, la estabilización y transporte de otras proteínas a los organelos. Las HSPs se han clasificado principalmente con base en sus pesos moleculares y su localización dentro de la célula. Algunas de las HSPs más comunes en plantas son: HSP 100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP20. Las HSPs pueden ser inducidas por otros tipos de estrés y son ampliamente conservadas (en su secuencia de aminoácidos y sus nucleótidos) tanto en plantas, animales y microorganismos (Vierling, 1991).

También se ha observado que las deficiencias nutricionales, son otro factor que puede causar cambios en el patrón de proteínas. Suzuki y colaboradores (1998) identificaron una proteína inducida por deficiencia de hierro

en las raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.). La secuencia de aminoácidos de ésta proteína mostró que correspondía a la enzima formato-deshidrogenasa. Los autores obtuvieron el cDNA de ésta proteína (fdh) y utilizando ésta como sonda, encontraron que se expresa tanto en condiciones de estrés anaeróbico como frente a una deficiencia de Fe. En este trabajo se sugiere que la expresión de la formato deshidrogenasa observada en la cebada con deficiencia de Fe, es un efecto secundario causado por la deficiencia de oxígeno.

Las infecciones por patógenos en las plantas, también inducen cambios en la expresión de proteínas. Se han identificado proteínas inducidas por hongos, bacterias y virus, sintetizadas en respuesta a la invasión de éstos patógenos. Estas proteínas se conocen como 'proteínas relacionadas a patógenos' (PR) y se han clasificado en varios grupos (Van Loon et. al., 1994), aunque no se conocen la mayoría de sus funciones. Algunas de las PR identificadas tienen actividad de glucanasas y quitinasas (Kauffmann et. al., 1987). Las proteínas PR también pueden ser inducidas por otros tipos de estrés, como la toxicidad por aluminio; Cruz-Ortega y Ownby (1993) identificaron una proteína (TAI-18), en raíces de trigo expuestas a aluminio (80 µM); esta proteína fue similar a la PR2 inducida por patógenos en cultivos de células de perejil.

Otras proteínas son aquellas que se expresan abundantemente durante los estados finales de desecación de las semillas, estas proteínas ('late embryogenesis abundant proteins' LEA) fueron originalmente identificadas a partir de la secuencia de sus genes (*lea*). Las LEA se expresan también en los tejidos de plantas sometidas a estrés hídrico, osmótico y a bajas temperaturas y se han clasificado en 6 grupos con base en su secuencia de aminoácidos. Se ha propuesto que las funciones de las LEA pueden estar relacionadas con el secuestro de iones, protección de membranas y restauración de proteínas desnaturalizadas durante estos tipos de estrés (Bray, 1993).

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las plantas con potencial alelopático utilizadas en el presente estudio fueron: *Acacia cedilloi* (L.) Rico (Leguminosae), *Lantana* sp (Verbenaceae), *Sebastiania adhenophora* Pax. et Hoff (Euphorbiaceae) y *Sicyos deppei* (G.) Don (Cuburbitaceae). Todas estas especies han mostrado tener un potencial fitotóxico y son objeto de un estudio fitoquímico biodirigido para determinar los compuestos químicos responsables de su actividad (Anaya y del Amo, 1999).

El lixiviado acuoso de *Sicyos deppei* inhibe significativamente el crecimiento radicular de varias especies cultivadas como el maíz, frijol, calabaza, jitomate, amaranto y del pasto elefante (*Echinochloa crusgalli*) (Hernández, et. al., 1996). Actualmente se tienen datos que indican que los compuestos fitotóxicos de *Sicyos* pueden ser esteroides (Anaya, comunicación personal). En el caso de las otras especies, existen reportes en la literatura de compuestos químicos identificados en ellas. *Sebastiania schottiana* posee xantoxilinas que inhiben el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Stafilococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Proteus mirabilis*,

en las raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.). La secuencia de aminoácidos de ésta proteína mostró que correspondía a la enzima formato-deshidrogenasa. Los autores obtuvieron el cDNA de ésta proteína (fdh) y utilizando ésta como sonda, encontraron que se expresa tanto en condiciones de estrés anaeróbico como frente a una deficiencia de Fe. En este trabajo se sugiere que la expresión de la formato deshidrogenasa observada en la cebada con deficiencia de Fe, es un efecto secundario causado por la deficiencia de oxígeno.

Las infecciones por patógenos en las plantas, también inducen cambios en la expresión de proteínas. Se han identificado proteínas inducidas por hongos, bacterias y virus, sintetizadas en respuesta a la invasión de éstos patógenos. Estas proteínas se conocen como 'proteínas relacionadas a patógenos' (PR) y se han clasificado en varios grupos (Van Loon et. al., 1994), aunque no se conocen la mayoría de sus funciones. Algunas de las PR identificadas tienen actividad de glucanasas y quitinasas (Kauffmann et. al., 1987). Las proteínas PR también pueden ser inducidas por otros tipos de estrés, como la toxicidad por aluminio; Cruz-Ortega y Ownby (1993) identificaron una proteína (TAI-18), en raíces de trigo expuestas a aluminio (80 µM); esta proteína fue similar a la PR2 inducida por patógenos en cultivos de células de perejil.

Otras proteínas son aquellas que se expresan abundantemente durante los estados finales de desecación de las semillas, estas proteínas ('late embryogenesis abundant proteins' LEA) fueron originalmente identificadas a partir de la secuencia de sus genes (*lea*). Las LEA se expresan también en los tejidos de plantas sometidas a estrés hídrico, osmótico y a bajas temperaturas y se han clasificado en 6 grupos con base en su secuencia de aminoácidos. Se ha propuesto que las funciones de las LEA pueden estar relacionadas con el secuestro de iones, protección de membranas y restauración de proteínas desnaturalizadas durante estos tipos de estrés (Bray, 1993).

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las plantas con potencial alelopático utilizadas en el presente estudio fueron: *Acacia cedilloi* (L.) Rico (Leguminosae), *Lantana* sp (Verbenaceae), *Sebastiania adhenophora* Pax. et Hoff (Euphorbiaceae) y *Sicyos deppei* (G.) Don (Cuburbitaceae). Todas estas especies han mostrado tener un potencial fitotóxico y son objeto de un estudio fitoquímico biodirigido para determinar los compuestos químicos responsables de su actividad (Anaya y del Amo, 1999).

El lixiviado acuoso de *Sicyos deppei* inhibe significativamente el crecimiento radicular de varias especies cultivadas como el maíz, frijol, calabaza, jitomate, amaranto y del pasto elefante (*Echinochloa crusgalli*) (Hernández, et. al., 1996). Actualmente se tienen datos que indican que los compuestos fitotóxicos de *Sicyos* pueden ser esteroides (Anaya, comunicación personal). En el caso de las otras especies, existen reportes en la literatura de compuestos químicos identificados en ellas. *Sebastiania schottiana* posee xantoxilinas que inhiben el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Stafilococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Proteus mirabilis*,

*Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morgani* (De Godoy et al., 1991). Misra y colaboradores (1997), encontraron que *Lantana camara* contenía en sus raíces altas concentraciones de ácido oleanólico, así como algunos de sus derivados. En *Acacia nilotica* se han encontrado complejos polifenólicos, flavonas, taninos y glucósidos, los cuales presentaron actividad antifúngica sobre *Fusarium oxysporum* (Bhargava-Alka, et. al., 1998).

Con base en estos antecedentes el objetivo general y los particulares del presente trabajo fueron los siguientes,

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de los lixiviados acuosos de las cuatro plantas con potencial alelopático, sobre el crecimiento radicular de maíz, frijol, calabaza y jitomate *in vitro*, así como el efecto de estos lixiviados sobre el patrón de proteínas citoplásmicas de las raíces de estas plantas cultivadas.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar cuantitativamente el efecto del estrés aleloquímico *in vitro* sobre el crecimiento de la raíz de las plantas cultivadas, así como los cambios cualitativos que presentan las raíces al ser expuestas a los lixiviados.
2. Evaluar los cambios en el patrón de proteínas de las raíces de las plantas cultivadas expuestas al estrés aleloquímico, por medio de la técnica de electroforesis (2D-PAGE).
3. Analizar, por medio de un escán, los geles de proteínas (2D-PAGE) para determinar si los cambios observados son significativos.
4. Determinar los pesos moleculares de las proteínas modificadas significativamente en las raíces de las cuatro plantas cultivadas, con el fin de comparar si el efecto del estrés aleloquímico afecta de igual modo su patrón de proteínas o si es selectivo.
5. Analizar el efecto del herbicida 'Alaclor' sobre el crecimiento de la raíz de las plantas cultivadas, así como sobre el patrón de síntesis de proteínas en raíces de frijol y jitomate.

## METODOLOGÍA

### **Material Biológico:**

Las plantas con potencial alelopático utilizadas para producir el estrés aleloquímico sobre las plantas cultivadas, fueron las siguientes:

1. *Acacia cedilloi* L. Rico (Leguminosae) (Zubinché)
2. *Lantana* sp, (Verbenaceae) (Lantana)
3. *Sebastiania adenophora* Pax. et Hoff (Euphorbiaceae) (Zak chechén)
4. *Sicyos deppei*, G. Don (Cucurbitaceae) (Chayotillo)

Las tres primeras especies forman parte de las comunidades vegetales de la reserva ecológica 'El Edén' en el estado de Quintana Roo, México donde fueron colectadas y algunas de ellas tienen uso medicinal. La última, *Sicyos deppei*, es una maleza de gran importancia económica por ser una de las más peligrosas plagas de los cultivos en la zona chinampera de Xochimilco y en la parte central de México, fue colectada en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel, en la Ciudad Universitaria, D. F. La parte aérea de las plantas se secó al aire para posteriormente utilizar sus hojas.

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

- Cucurbita pepo* L (Cucurbitaceae) (Calabaza Criolla)
- Zea mays* L, Gramineae (Maíz Chinampero)
- Phaseolus vulgaris* L (Leguminosae) (Frijol Flor de Mayo)
- Lycopersicon esculentum* L (*Solanaceae*) (Jitomate)

### **BIOENSAYOS IN VITRO**

Los bioensayos se realizaron en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar.

LIXIVIADOS ACUOSOS. Se obtuvieron lixiviados acuosos utilizando 2g de las hojas secas de: *Acacia*, *Lantana*, *Sebastiania* y *Sicyos*, y se remojaron en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril durante 3 horas. Los lixiviados se esterilizaron por medio de un filtro Millipore (0.45µm). Se midió la presión osmótica (mOsm/L) de cada lixiviado, con un osmómetro (OSMETTE A) de punto de congelación, con el fin de no rebasar el límite de tolerancia de las semillas de prueba a este factor.

PROCESAMIENTO DE LAS SEMILLAS. Las semillas de calabaza, maíz, frijol y jitomate se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 5 min. Se enjuagaron exhaustivamente con agua destilada estéril para quitar los residuos de cloro.



**SUSTRATO PARA LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.** En una caja de petri, se adicionaron 10mL de cada lixiviado al 2%, mezclándolo con 10mL de agar estéril al 2%. El control consistió en una mezcla 1:1 de agar estéril al 2% y agua destilada estéril. Una vez solidificado el agar se colocaron sobre él 10 semillas de la respectiva planta de prueba.

**DISEÑO EXPERIMENTAL.** Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento bajo un diseño completamente al azar; las cajas de petri se colocaron en una estufa de germinación a 27°C y en la obscuridad. Después de 48 horas se determinó el porcentaje de germinación y la longitud radicular (mm) de las plántulas de calabaza, maíz y frijol, y después de 72 horas, las del jitomate. Los datos de crecimiento radicular fueron analizados por medio de un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

**BIOENSAYOS CON EL HERBICIDA ALACLOR.** Con el fin de comparar el efecto del estrés aleloquímico sobre la raíz de las plantas cultivadas con el de un herbicida comercial, se realizaron bioensayos probando el herbicida alaclor, 2 cloro (2'-6'-dietil-N-metoximetil) acetanilida sobre las plantas de prueba. Se ha reportado que este herbicida inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Merlin, 1996). Este herbicida es pre-emergente y controla malezas de hoja ancha (*Amaranthus* spp., *Capsella* spp., etc.), así como pastos anuales (*Echinochloa* spp. y *Digitaria* spp.).

Las plantas cultivadas fueron sometidas a 5 concentraciones del herbicida: 0.1, 1, 10, 100 y 1000 ppm. El herbicida se incorporó a agar al 2% y el sustrato resultante lo contenía a las concentraciones mencionadas. Estos bioensayos se realizaron en las mismas condiciones y de la misma manera que los bioensayos con los lixiviados acuosos.

### **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

**OBTENCIÓN DE RAÍCES.** Para la extracción de proteínas, se utilizaron 20 cajas de petri con 10 semillas cada una por tratamiento: control y lixiviados de: *Acacia*, *Lantana*, *Sebastiania* y *Sicyos*. Después del tiempo de incubación, se cortaron los 5 mm de la punta de cada raíz; este material biológico se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C para su uso posterior.

**PROCESAMIENTO DE LAS RAÍCES Y OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLÁSMICAS.** Las raíces de las plántulas se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Después se les adicionó un amortiguador de extracción [K-PO<sub>4</sub>, 50mM (Sigma), pH 6.8, mercaptoetanol 1mM (Bio-Rad)] (Hird, et al.;1993) en una relación de 1g de tejido por 4mL de amortiguador y se terminó de homogeneizar con un vástago de vidrio. Después se centrifugó diferencialmente a 8 000 g durante 10 minutos a 4°C, para remover los residuos celulares. El sobrenadante se extrajo con fenol, saturado con agua, en una proporción 1:1, agitando cuidadosamente y esperando de 15 a 30 minutos; se centrifugó a 3600 g. durante 10 minutos para separar las fases. La fase orgánica, conteniendo las proteínas, se transfirió a un tubo limpio; las proteínas

se precipitaron con acetato de amonio al 0.1M (Baker) en metanol (Baker), a -20°C; se centrifugaron a 3600 g por 10 minutos para obtenerlas concentradas en un botón; éste se lavó varias veces con metanol-acetato de amonio y con acetona para quitar cualquier residuo de fenol. Todas estas muestras se secaron y se solubilizaron con un amortiguador para geles IEF (separación por punto isoeléctrico) que consiste en urea 9M (Sigma), CHAPS<sup>1</sup> 4% (Bio-Rad), DTT<sup>2</sup> 0.5% (Bio-Rad) y un rango de amfolitos de 5/7 al 2% y de 3/10 al 0.75% (Bio-Rad) (Hurkman y Tanaka, 1988). La cantidad de proteína citoplásmica se determinó por el método de Bradford (1984).

### ***ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)***

Se realizó la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) de acuerdo al método de O'Farrell (1975), utilizando el aparato de electroforesis Mini Protean II de Bio-Rad.

*Primera dimensión.* Se preparó el gel de separación por punto isoeléctrico (IEF) con urea 9.2M, CHAPS 2.5%, acrilamida-bis 4% (Bio-Rad), amfolitos en un rango de 5:2 (5% de 5/7 y 2% de 3/10), persulfato de amonio 0.01% (Biorad) y TEMED 0.1% (Bio-Rad). Se utilizaron tubos capilares de 1mm de diámetro; los geles se dejaron polimerizar durante 2hrs y a cada tubo se le añadieron 10 µg de proteína y 15 µL de amortiguador de carga (9M de urea, amfolitos 0.8% de 5/7 y 0.2% de 3/10). Los tubos se colocaron en el adaptador y se llenó la cámara superior con amortiguador para el cátodo {NaOH 100 mM (Baker)}, y la cámara inferior con amortiguador para el ánodo {H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM (Baker)}. La electroforesis se corrió primero a 500 volts por 10 min y después a 750 volts durante 3.5 hrs. Al terminar se sacaron los geles, se congelaron inmediatamente sobre hielo seco y se guardaron a -70°C.

*Segunda dimensión (SDS-PAGE).* Para la separación de las proteínas por peso molecular, los geles (IEF) se equilibraron con un amortiguador de Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.8, 2.3% (peso/volumen) SDS, 10% de glicerol (peso/volumen), 0.05% (peso/volumen) azul de bromofenol y 5% de β-mercaptoetanol. Los geles IEF equilibrados se colocaron sobre el gel resolvidor desnaturalizante, con acrilamida al 12% y con un gel concentrador de acrilamida al 4%. Como referencia, en un pozo se colocaron los marcadores de peso molecular preteñidos (Bio-Rad). El amortiguador de corrimiento contenía Trisma-base 25 mM, glicina 0.192 mM y 1% SDS. Los geles se corrieron por 15 minutos a 50 volts y posteriormente a 100 volts durante 2 h aproximadamente o hasta que el indicador llegara al fondo. Los geles se fijaron en una solución de 50% de metanol y 10% de ácido acético, y se tiñeron con nitrato de plata con la técnica de Oakley y colaboradores (1980); la concentración mínima detectable de proteína por este método es de aproximadamente 0.02µg.

<sup>1</sup>CHAPS, 3-[(propil cloramida) dimetil amonio]- 1-propanosulfonato

<sup>2</sup> DTT, ditiotreitól

En el caso de los bioensayos con herbicida, y por razones de tiempo, sólo las raíces de frijol y jitomate (las más inhibidas por el alaclor), fueron analizadas por medio de la electroforesis 2D-PAGE para observar las modificaciones en su patrón de síntesis y comparar los resultados con los de los lixiviados.

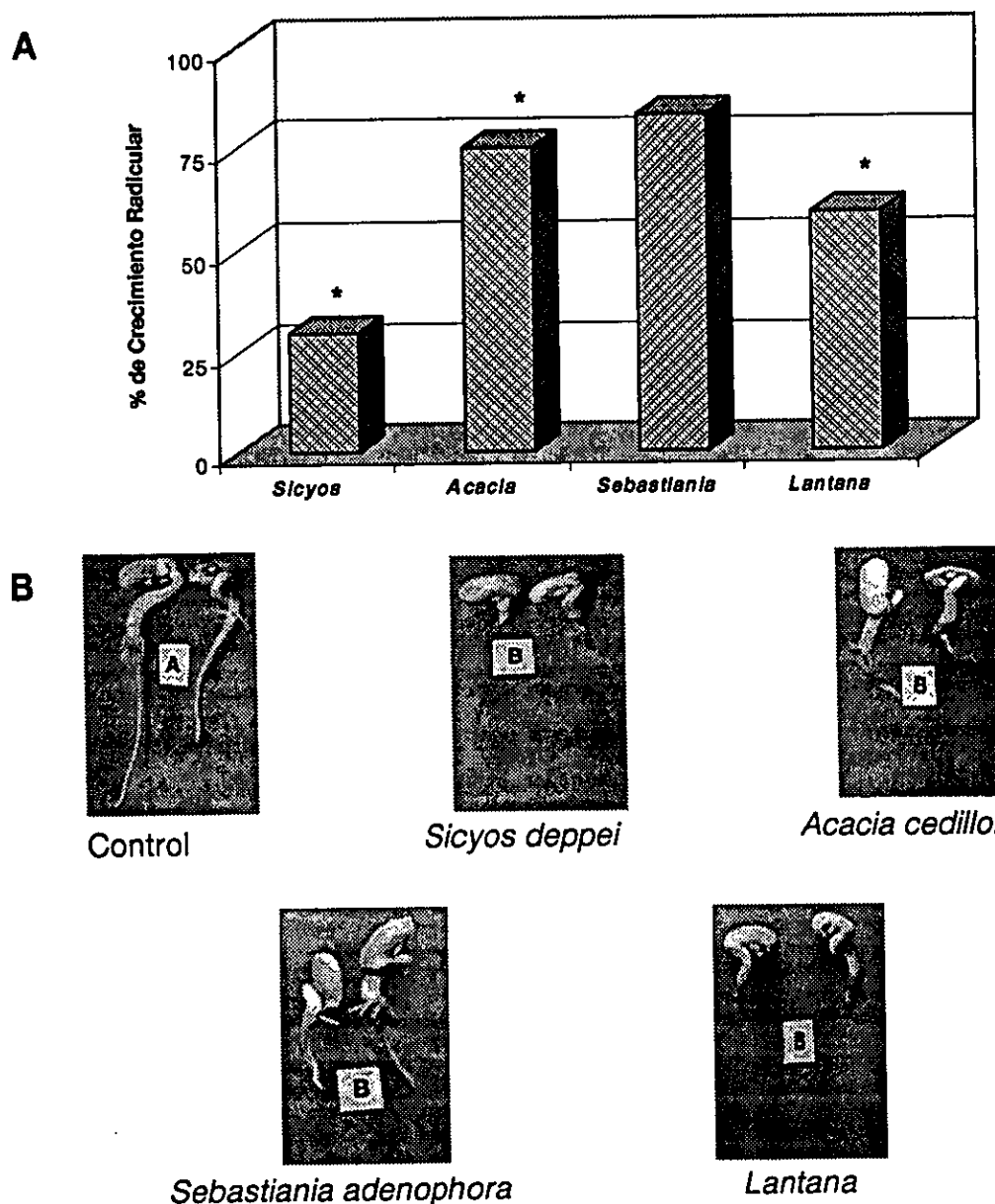
### ***ANÁLISIS DE GELES CON EL SCAN GSXL***

Los geles fueron analizados por densitometría de láser con el programa Gel-Scan XL versión 2.1 (1989), con el fin de determinar los cambios más importantes del patrón de proteínas de los tratamientos con respecto a su control. En la imagen del control y del tratamiento, la cuantificación de cada proteína fue hecha sobre el modelo de puntos tomando en cuenta la absorbancia que obtuvo cada uno, (se resta la absorbancia del fondo); al compararse el patrón del tratamiento con el del control, se pudieron detectar los principales cambios. De esta manera se calcularon los efectos del respectivo lixiviado acuoso sobre el patrón de proteínas, las cuales podían ser aumentadas, disminuidas, desaparecidas o sintetizadas por primera vez.

Se determinaron los pesos moleculares relativos de las proteínas que presentaron los cambios más importantes, graficándose el logaritmo de los pesos moleculares de los estándares contra la distancia alcanzada por la proteína de interés.

## RESULTADOS

### I. EFECTO DE LOS LIXIVIADOS ACUOSOS DE LAS HOJAS SECAS DE *SICYOS*, *ACACIA*, *SEBASTIANIA* Y *LANTANA* SOBRE *PHASEOLUS VULGARIS*

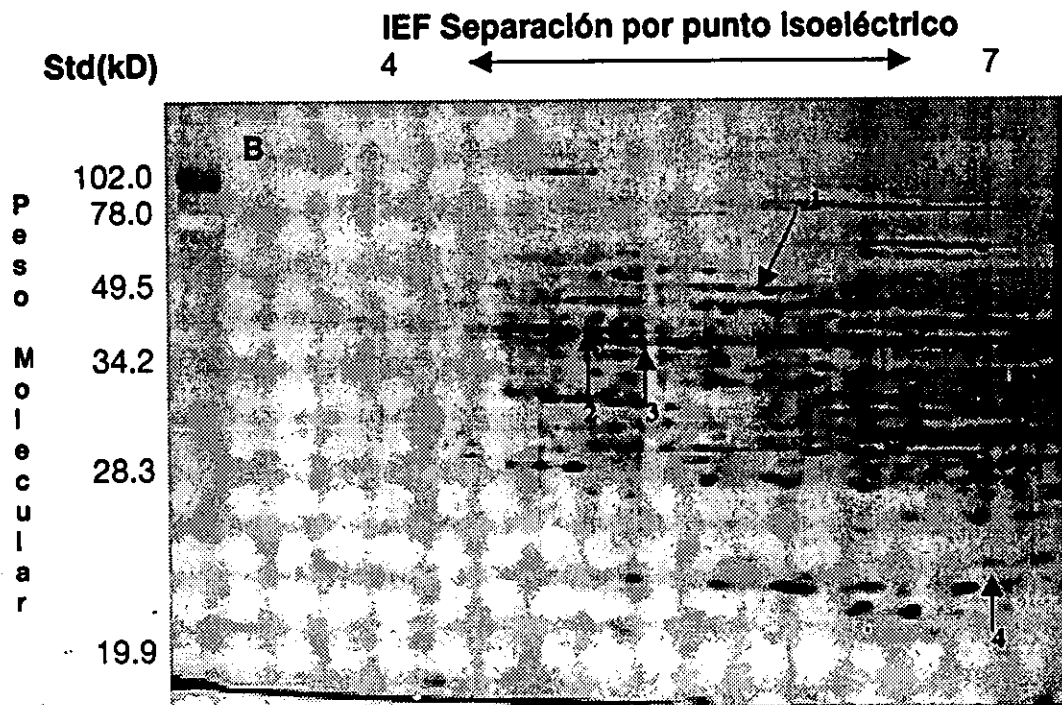


**Figura 2, A y B.** Efecto de los lixiviados acuosos (1%) de las hojas secas de las plantas alelopáticas sobre el crecimiento radicular de *Phaseolus vulgaris*. (\* $p < 0.05$ ). El promedio de crecimiento de las raíces del control fue considerado como el 100%.

Los resultados de los bioensayos para evaluar los efectos de los lixiviados acuosos de las plantas alelopáticas sobre el frijol se pueden observar en la Figura 2 A y B. El lixivado acuoso de *Sicyos* tuvo el mayor efecto inhibitorio (70%) sobre el crecimiento de la raíz de frijol; seguido por el de *Lantana*, el cual inhibió 41% el crecimiento de la raíz; *Acacia* lo inhibió 25%. El efecto de *Sebastiania* no fue significativo.

Las figuras de los geles de dos dimensiones (2D-PAGE) de las proteínas citoplásmicas de la raíz del frijol con cada lixivado acuoso (B), muestran los cambios principales señalados con flechas y números. En el control (A), también se incluyen flechas y números, en las correspondientes proteínas, con el fin de facilitar la comparación entre (A) y (B).

La Tabla 2 muestra el análisis del escán (XL 2.1) con las absorbancias máximas de las proteínas, tanto del control como del tratamiento. Las letras en las tablas indican los cambios en las absorbancias de las proteínas con respecto al control: proteínas que aumentaron (A), disminuyeron (D), desaparecieron (E) y proteínas nuevas (N), también se incluye el peso molecular relativo (kD) de cada proteína.



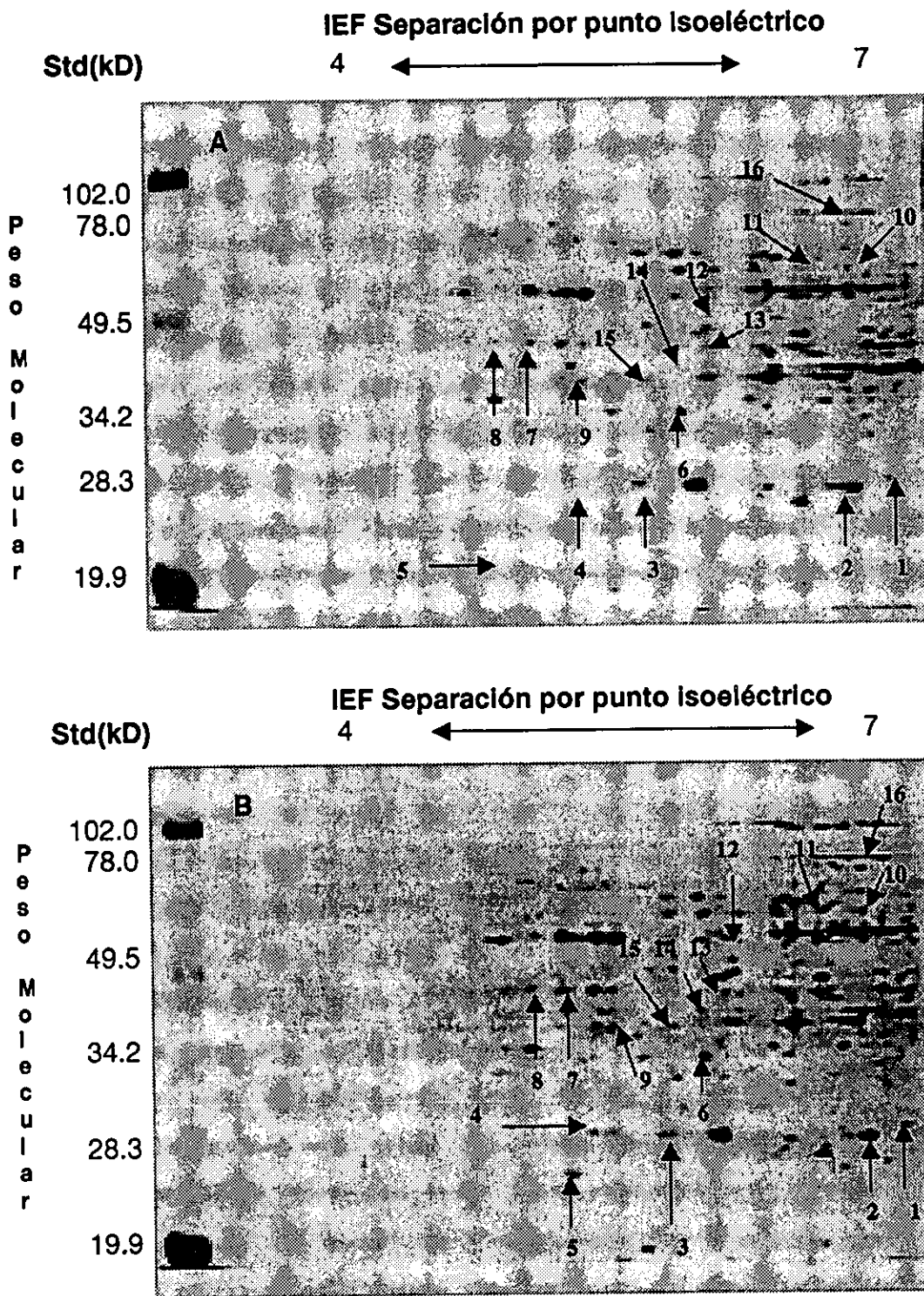
**Figura 3.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de frijol. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sicyos deppei* (B). 10µg de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de frijol que presentaron los principales cambios, tanto en el control como en del lixiviado acuoso de *Sicyos deppei*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo(kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.51	0.24 (D)*	25.8
2	0.35	0.17 (D)*	59.4
3	0.41	0.19 (D)*	57.9
4	0.14	0.04 (D)*	28.7

(D)\* Proteínas que disminuyeron más del 50% con respecto al control.

La Tabla 2 muestra que cuatro proteínas fueron las que disminuyeron su absorbancia más del 50%, las proteínas 1 y 4 son de bajo peso molecular y la 2 y 3 son de mediano peso molecular. En la Figura 3, se observa que son muy pocas las proteínas que se modifican por el tratamiento con el lixiviado de *Sicyos*, si consideramos que éste inhibió un 70 % el crecimiento radicular del frijol. Este resultado sugiere que, probablemente, el sitio de acción de los compuestos aleloquímicos de *Sicyos*, pudieran ser otros procesos fisiológicos o también que las proteínas involucradas no fueran las citoplásmicas, sino las de membrana, las cuales no se analizaron en este trabajo. En un estudio sobre los efectos del lixiviado de *Sicyos* sobre la ultraestructura de la raíz del frijol y el chilacayote, se observó que la membrana celular se plasmoliza por el efecto de este lixiviado (Cruz-Ortega, et al., 1998), lo que refuerza la idea de que las proteínas afectadas son de membrana.



**Figura 4.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de frijol. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Acacia cedilloi* (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los efectos indicados en la tabla 3.

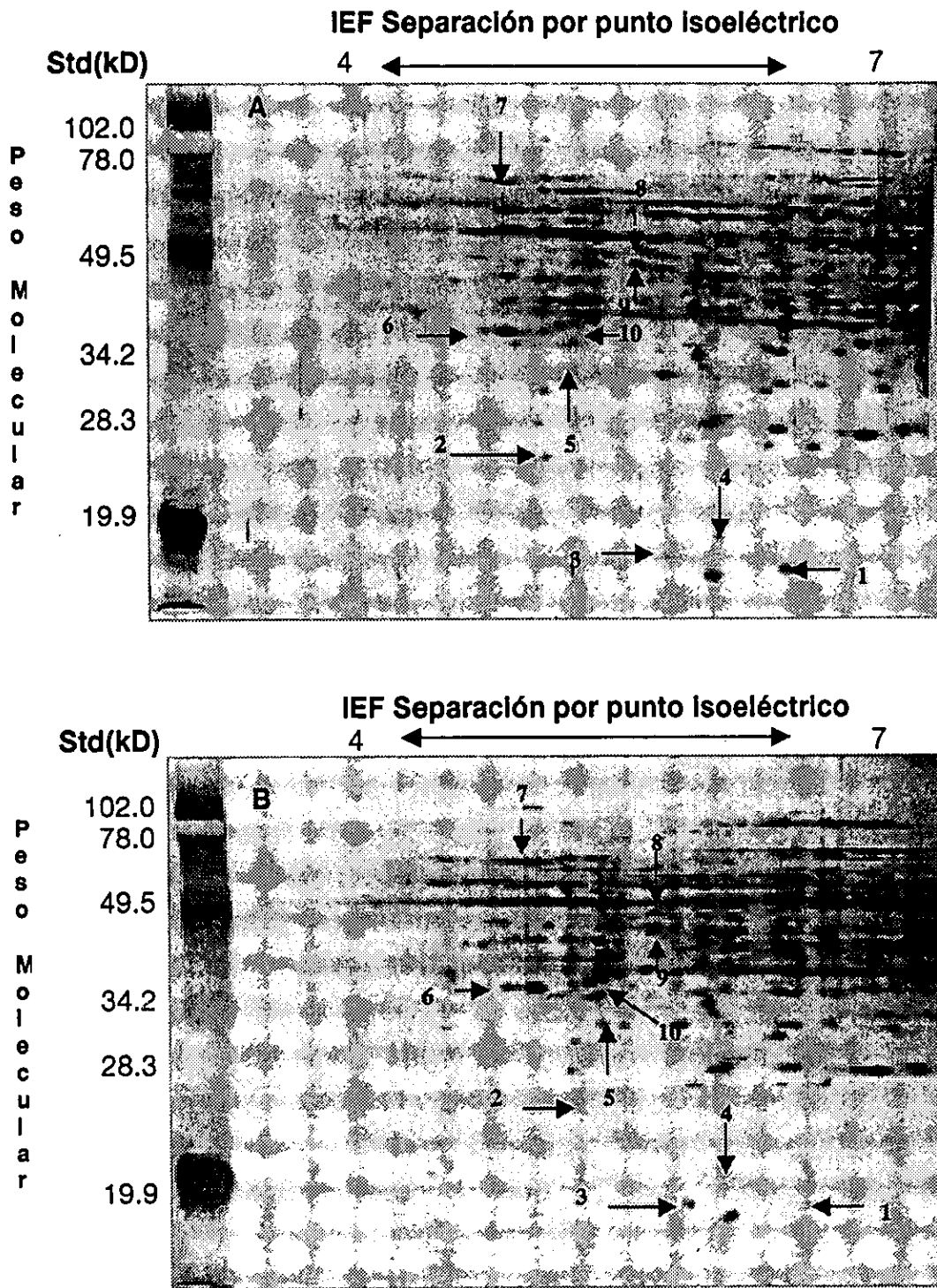


**Tabla 3.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de frijol que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Acacia cedilloi*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.15	0.59 (A)*	28.1
2	0.90	1.37 (A)	26.0
3	0.56	0.78 (A)	27.3
4	0.10	0.52 (A)*	28.1
5	0.15	0.58 (A)*	24.0
6	0.48	0.79 (A)	36.0
7	0.51	1.07 (A)*	47.4
8	0.16	0.70 (A)*	47.4
9	0.25	0.51 (A)*	41.3
10	0.33	0.92 (A)*	61.5
11	0.15	0.97 (A)*	62.3
12	0.14	0.84 (A)*	51.4
13	0.15	0.53 (A)*	46.1
14	0.13	0.51 (A)*	42.4
15	0.18	0.30 (A)	41.3
16	0.20	0.85 (A)*	71.5

(A)\* Proteínas que aumentaron su absorbancia más del 100% con respecto al control.

El lixiviado acuoso de *Acacia* inhibió un 25% el crecimiento radicular del frijol y modificó a un gran número de proteínas citoplásmicas (Figura 4 y Tabla 3). Todas las proteínas modificadas por el tratamiento, aumentaron su absorbancia significativamente con respecto a las proteínas del control. Este resultado es interesante, ya que el aumento en la absorbancia puede correlacionarse con un mecanismo de defensa que el frijol pudiera estar activando como respuesta al estrés aleloquímico producido por los metabolitos secundarios presentes en el lixiviado acuoso de *Acacia*. El aumento de la síntesis de varias proteínas constitutivas, se ha observado en otros tipos de estrés ambientales, por ejemplo, en el estrés hídrico se observa un aumento de las enzimas involucradas en la síntesis de osmolitos (osmoprotectores) (Vernon, et al., 1992); en *Mesembryantum crystalinum*, la isoenzima de la PEPcasa aumenta durante el estrés hídrico y salino (Forsthoefel, et al., 1995; Cushman, et al., 1997, 1999).



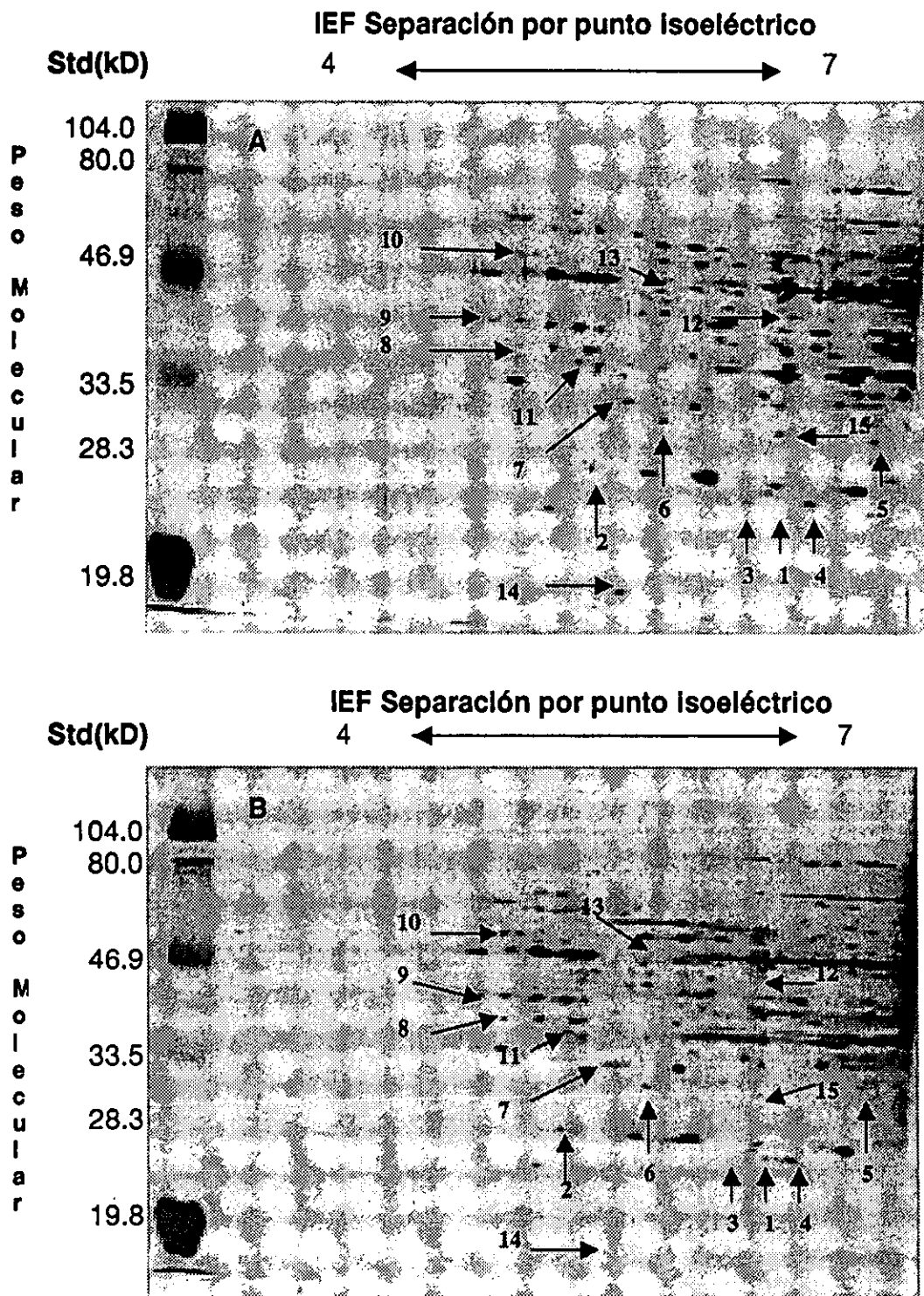
**Figura 5.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de frijol. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sebastiania adenophora* (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la tabla 4.

**Tabla 4.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de frijol que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Sebastiania adenophora*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.60	0.25 (D)*	15.0
2	0.46	0.32 (D)	24.0
3	0.17	0.28 (A)	15.5
4	0.19	0.12 (D)	17.6
5	0.08	0.32 (A)*	33.9
6	0.54	0.96 (A)	41.0
7	0.31	0.73 (A)*	63.4
8	0.24	0.41 (A)	59.6
9	0.49	0.84 (A)	63.4
10	0.33	0.72 (A)*	36.1

(A)\* Proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control. (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% con respecto al control.

Aunque el lixiviado de *Sebastiania* no inhibió significativamente el crecimiento radicular del frijol, el patrón de proteínas sí fue afectado por este tratamiento (Figura 5). La Tabla 4 muestra que 7 proteínas (3, 5-10) aumentaron su absorbancia; la 5, 7 y 10 aumentaron más del 100% y son de mediano peso molecular. Tres proteínas (1, 2 y 4) disminuyeron su absorbancia y son de bajo peso molecular. Es común observar aumentos y disminuciones en las concentraciones de las proteínas cuando las plantas son sometidas a cualquier tipo de estrés. Hurkman y Tanaka, (1988) encontraron que las concentraciones de las proteínas citoplásmicas de la raíz de cebada (*Hordeum vulgare* L.) aumentaron y disminuyeron por el efecto de un estrés salino, osmótico y por deficiencia de agua.



**Figura 6.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de frijol. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Lantana* (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separados en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la Tabla 5.

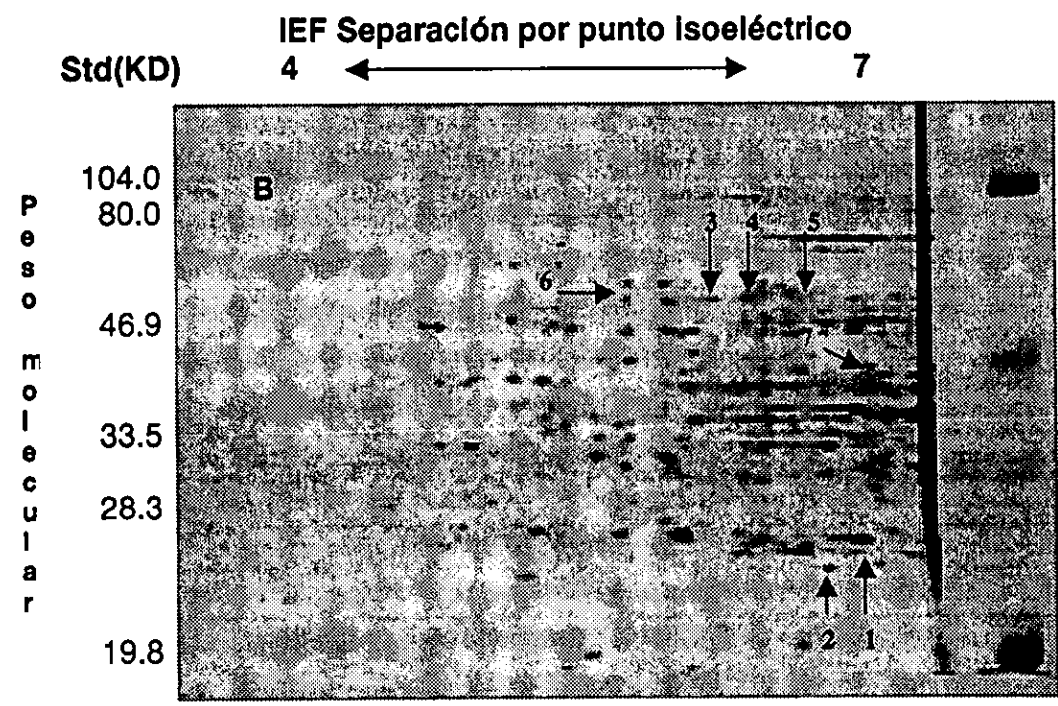
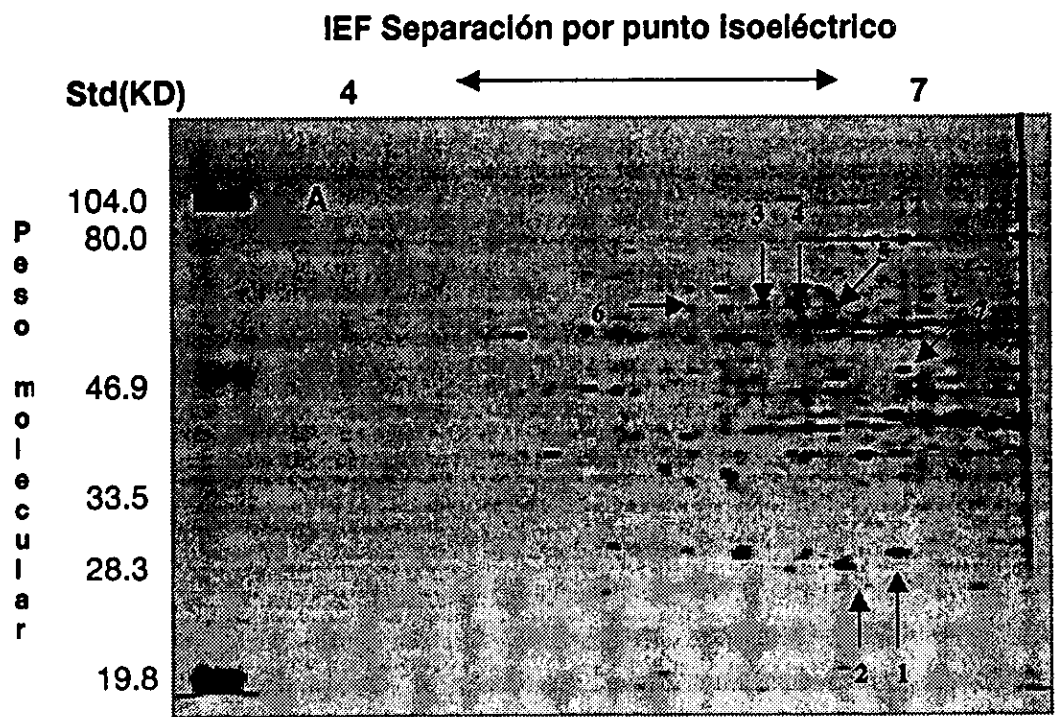
**Tabla 5.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces del frijol que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Lantana*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.00	0.42 (N)*	25.0
2	0.19	0.39 (A)*	26.0
3	0.34	0.09 (D)*	27.5
4	0.92	0.71 (D)	25.5
5	0.27	0.18 (D)	28.3
6	0.49	0.37 (D)	35.2
7	0.72	0.36 (D)*	34.8
8	0.10	0.25 (A)*	40.7
9	0.22	0.44 (A)*	46.0
10	0.25	0.60 (A)*	56.2
11	0.28	0.54 (A)*	40.2
12	0.44	0.13 (D)*	47.9
13	0.82	0.42 (D)*	54.1
14	0.57	0.15 (D)*	17.0
15	0.22	0.09 (D)*	32.8

(A)\* proteínas que tienen más del 100% de absorbancia con respecto al control, (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% con respecto al control y (N)\* proteína nueva.

El lixiviado acuoso de *Lantana* inhibió significativamente el crecimiento radicular del frijol (48%) y también afectó el patrón de proteínas citoplásmicas (Figura 6). Este es el caso contrario al de *Sicyos*, cuyo lixiviado causó una severa inhibición del crecimiento radicular, pero no modificó el patrón de proteínas.

En la Tabla 5 se observa que un gran número de proteínas disminuyeron su concentración más del 50% con respecto al control (3 y 7, 12-15) y son tanto de bajo como de mediano peso molecular. Otras proteínas, por el contrario, aumentaron su absorbancia (2, 8-11) y la mayoría son de mediano peso molecular. La proteína 1 apareció como nueva en el tratamiento. Como podemos ver en este caso las alteraciones que los polipéptidos sufrieron, podrían ser debidas al efecto de los metabolitos secundarios presentes en el lixiviado de *Lantana*, sobre algunas enzimas importantes para el crecimiento y desarrollo de la planta. Al analizar las proteínas de las hojas del maíz bajo un estrés hídrico, Riccardi y colaboradores (1998) observaron que algunos de los polipéptidos afectados eran enzimas, como la triosa fosfatoisomerasa, enolasa y la NAD-malato deshidrogenasa, involucradas en la glucólisis y ciclo de Krebs, que son dos rutas metabólicas importantes para la obtención de energía (ATP).



**Figura 7.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de frijol. Control (A) y tratamiento con el herbicida "alaclor" a 100 ppm (B). 10µg de proteína citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los efectos señalados en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas extraídas de las raíces de frijol que presentaron los principales cambios, tanto del control como del tratamiento con el herbicida "alacior" a 100 ppm.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	control	herbicida	
1	0.0	0.31 (N)*	26.5
2	0.25	0.37 (A)	24.1
3	0.56	0.24 (D)*	60.2
4	0.49	0.33 (D)	61.3
5	0.44	0.22 (D)*	61.6
6	0.45	0.28 (D)	60.5
7	0.41	0.63 (A)	49.5

(D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% con respecto al control y (N)\* proteína nueva.

Como se puede observar el herbicida afectó a siete proteínas: cuatro (3-6) disminuyeron su absorbancia (la 3 y la 5 disminuyeron más del 50%). Dos proteínas (2 y 7) de bajo y mediano peso molecular aumentaron su absorbancia. Una proteína (1) apareció con el tratamiento del herbicida.

**Tabla 7.** Resumen del efecto de los lixiviados acuosos (1%) de las partes aéreas de *Sicyos deppei*, *Acacia cedilloi*, *Sebastiania adenophora*, *Lantana* y el herbicida sobre el patrón de síntesis de proteínas citoplásmicas de raíces de *Phaseolus vulgaris*.

Plantas Alelopáticas	NÚMERO DE PROTEÍNAS MODIFICADAS POR LOS TRATAMIENTOS				
	Aumentan (A)	Disminuyen (D)	Desaparecen (E)	Nuevas (N)	Total
<i>Sicyos</i>	-	4	-	-	4
<i>Acacia</i>	16	-	-	-	16
<i>Sebastiania</i>	7	3	-	-	10
<i>Lantana</i>	5	9	-	1	15
Herbicida	2	4	-	1*	7

En la Tabla 7 se resume el número de proteínas que presentaron modificaciones con los tratamientos. Los lixiviados de *Acacia* y *Lantana* afectaron un mayor número de proteínas. Con el tratamiento de *Lantana* apareció una proteína nueva, la cual no fue inducida por los otros tratamientos (Figura 6). El lixiviado de *Sebastiania* afectó a 10 proteínas, de las cuales 7 aumentaron y 3 disminuyeron. El lixiviado acuoso de *Sicyos*, aunque inhibió el 70% el

crecimiento de la raíz, solo afectó a 4 proteínas, todas las cuales disminuyeron. Por otra parte el herbicida afectó a 7 proteínas, de las cuales una apareció como nueva, aunque no es la misma que apareció con el tratamiento con *Lantana*; de este modo, el cambio en el número y tipo de proteínas parece ser específico en cada tratamiento.

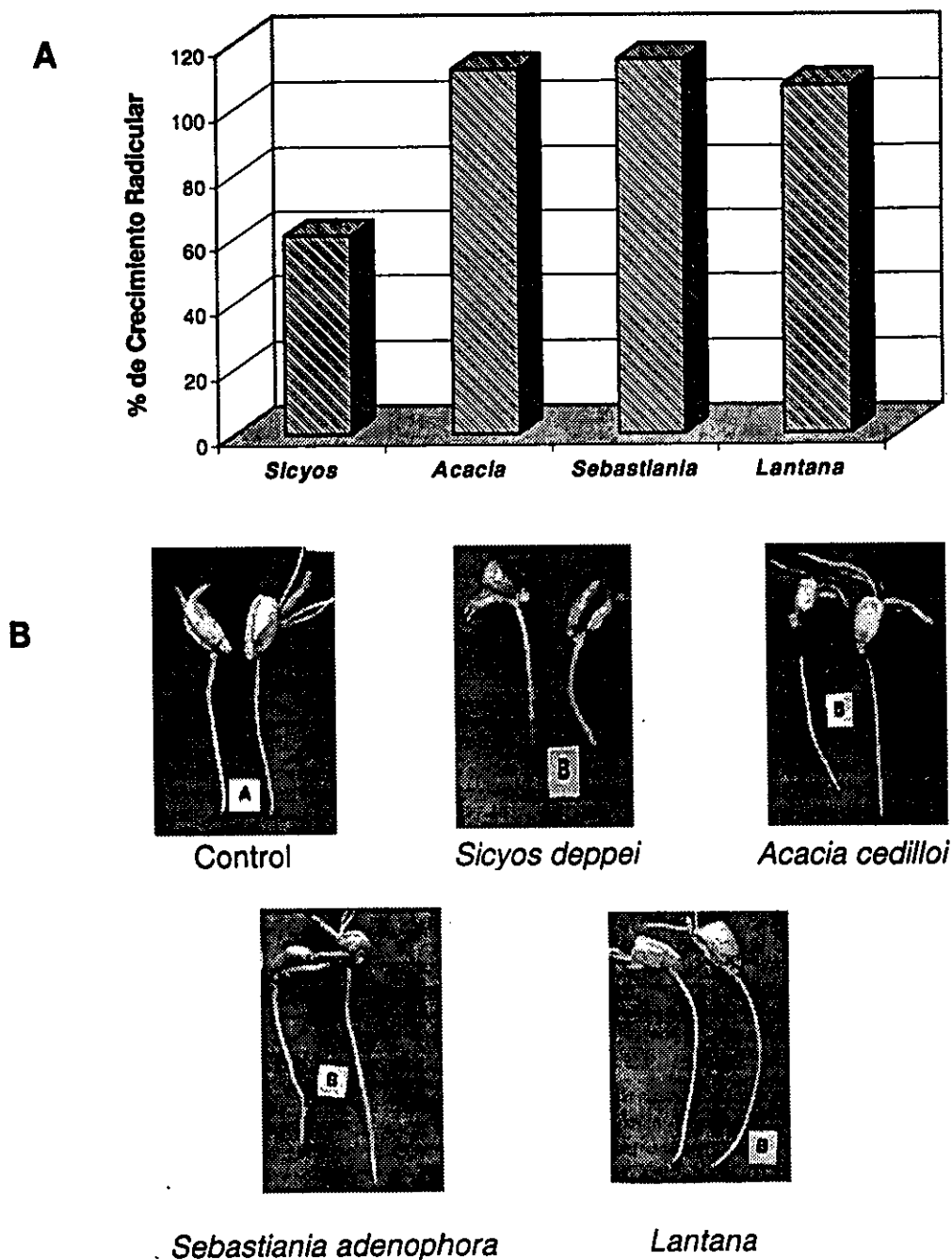
**Tabla 8.** Proteínas citoplásmicas extraídas de la raíz de frijol, con pesos moleculares y punto isoeléctrico (pI) similares, que fueron afectadas por los diferentes tratamientos.

Proteína (kD)	pI	<i>Sicyos deppel</i>	<i>Acacia cedilloi</i>	<i>Sebastiania adenophora</i>	<i>Lantana.</i>	Herbicida
24.0	5.8	-	A	D	-	-
25.0	6.7	-	-	-	N	-
26.0	5.9	-	A	-	A	-
26.5	6.9					N

En la Tabla 8 se observa que una proteína ácida de 24 kD, aumentó su absorbancia con *Acacia* y disminuyó con *Sebastiania*. La proteína de 26 kD y pI de 5.9 aumentó con *Acacia* y *Lantana*; la proteína de 25 kD y pI de 6.7 apareció con *Lantana* y una proteína de 26.5 kD apareció con el herbicida. Estos resultados nos muestran que sólo los tratamientos de *Acacia* y *Lantana* modificaron de forma similar, a una proteína (de 26 kD), aumentándola; los demás tratamientos afectan de manera específica el patrón de proteínas y ninguno es equivalente a otro. Esto indica que la composición química del tratamiento es determinante para que se modifique o no el patrón de proteínas, y para que se modifique una u otra proteína.



II. EFECTO DE LOS LIXIVIADOS ACUOSOS DE LAS HOJAS SECAS DE *SICYOS*, *ACACIA*, *SEBASTIANA* Y *LANTANA* SOBRE *ZEA MAYS*.

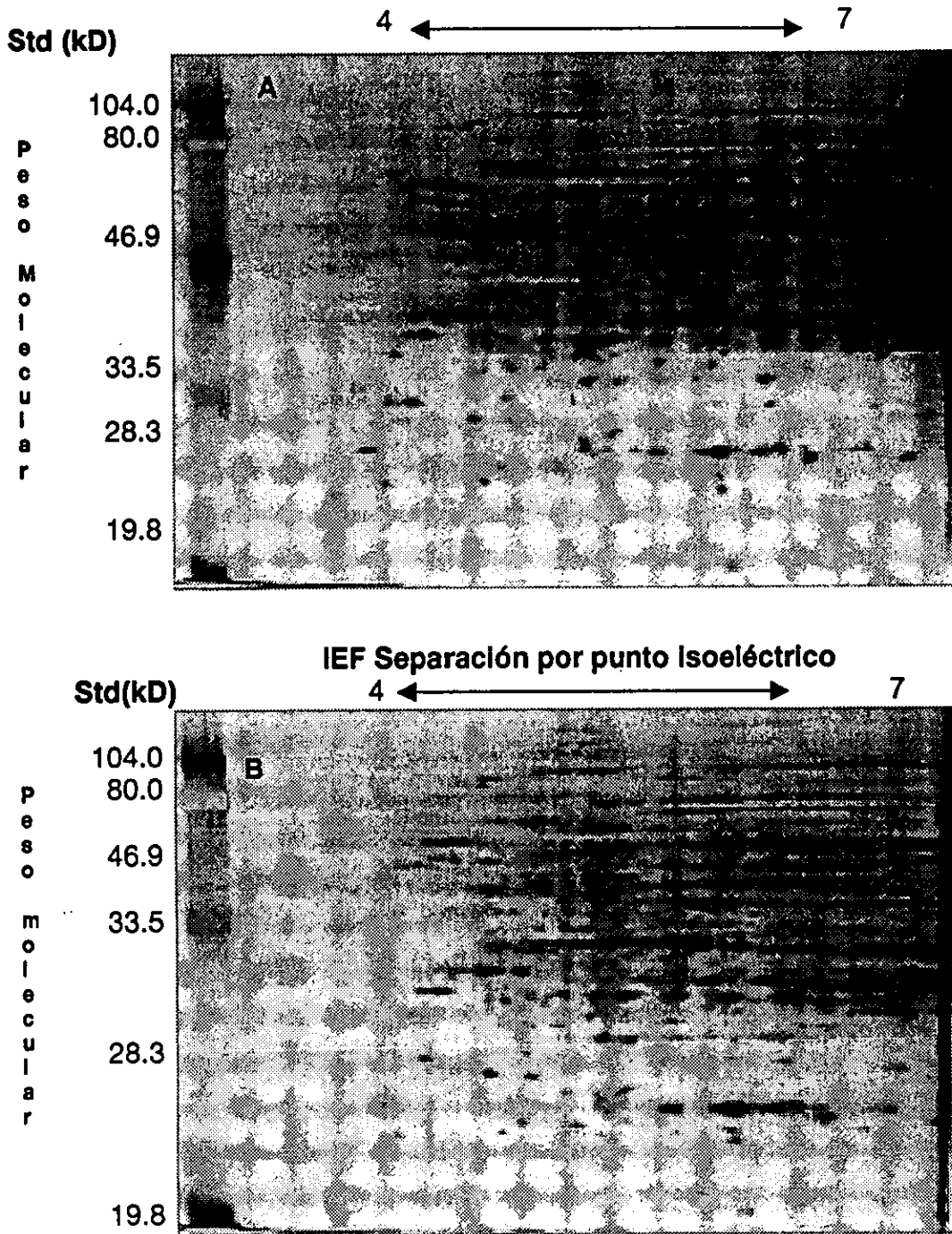


**Figura 8, A y B.** Efecto de los lixiviados acuosos (1%) de las hojas secas de las plantas alelopáticas sobre el crecimiento radicular de *Zea mays* (\*  $p < 0.05$ ). El promedio de crecimiento de las raíces del control fue considerado como el 100%.

En la Figura 8 (A y B) se observa que el lixiviado acuoso de *Sicyos*, es el único tratamiento que inhibe significativamente (43%) el crecimiento radicular del maíz. Por el contrario, los lixiviados de *Acacia*, *Sebastiania* y *Lantana*, aparentemente lo estimulan, aunque este efecto no es significativo.

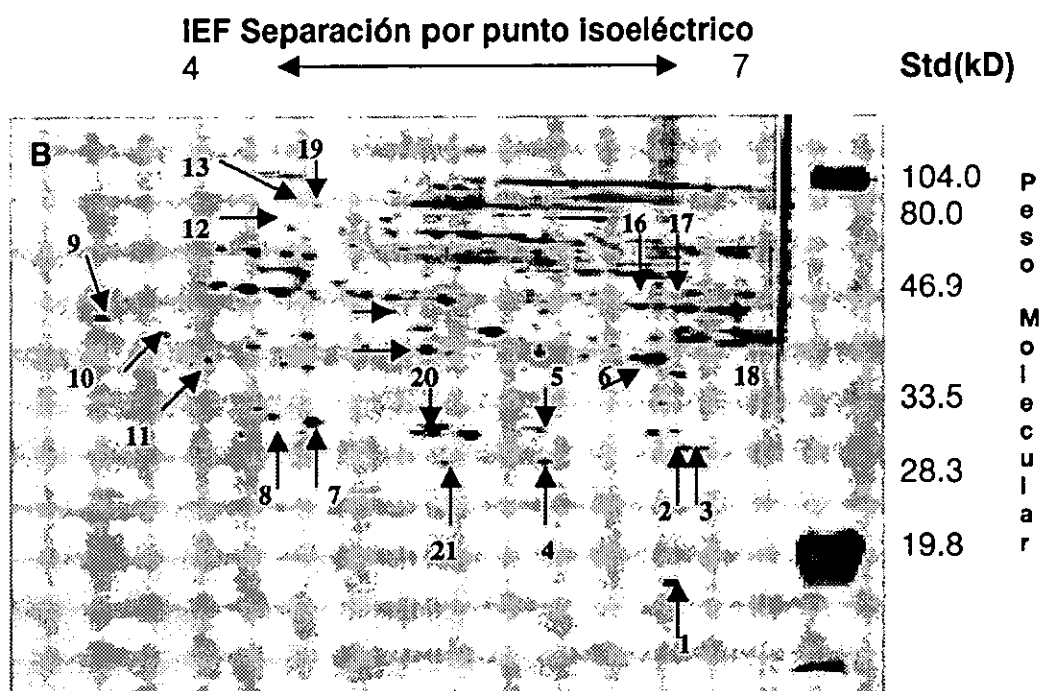
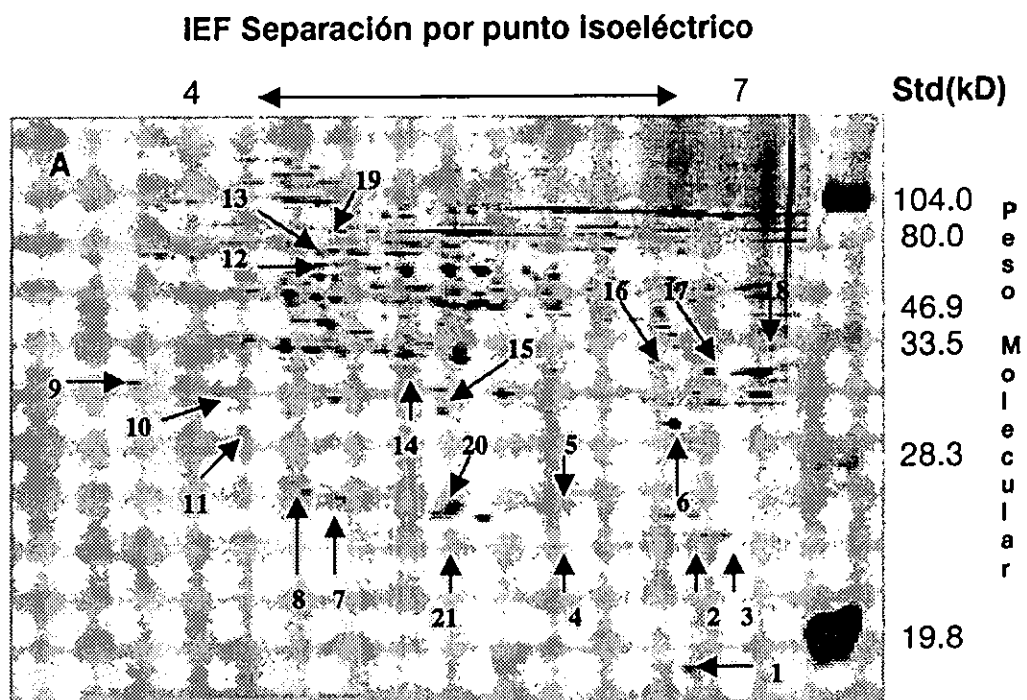
A continuación se muestran las figuras de los geles de dos dimensiones de las proteínas citoplásmicas (2D-PAGE) de la raíz de maíz con cada tratamiento, en donde los cambios principales son señalados con flechas y números tanto en el control (A) como en el tratamiento (B). Las tablas muestran el análisis del scan (XL 2.1) con las absorbancias máximas de las proteínas del control y del tratamiento. Las letras en las tablas indican los cambios en las absorbancias de las proteínas con respecto al control: proteínas que aumentaron (A), disminuyeron (D), desaparecieron (E) y proteínas nuevas (N), también se incluye el peso molecular relativo (kD) de cada proteína.

## IEF Separación por punto Isoeléctrico



**Figura 9.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de maíz. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sicyos deppei* (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel.

Aunque el lixiviado de *Sicyos* inhibió significativamente el crecimiento radicular del maíz (como en el caso del frijol, Figura 3), el patrón de proteínas no muestra ninguna modificación (Figura 9). Al igual que con el frijol, el lixiviado de *Sicyos* puede estar afectando otros procesos fisiológicos en la raíz del maíz, o bien, puede estar alterando proteínas que no son citoplásmicas. Se ha observado que los lixiviados acuosos de *Sicyos* afectan significativamente el crecimiento de otras plantas como son: lechuga (*Lactuca sativa* L.), amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y el pasto elefante (*Echinochloa crusgalli* L.) (Hernández-Bautista, et al., 1996), pero su efecto a nivel fisiológico apenas empieza a investigarse. En todas las raíces de las distintas especies tratadas con el lixiviado de *Sicyos*, se observó un engrosamiento de la punta de la raíz. Este efecto también se ha observado cuando las raíces del trigo son sometidas al estrés por aluminio (Puthota, 1991; Cruz-Ortega y Ownby, 1993). Este engrosamiento puede deberse a una inhibición de la elongación celular, más que a una inhibición de la división celular, aunque esto no ha sido comprobado.



**Figura 10.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de maíz. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Acacia cedilloi* (B). 10µg de proteínas citoplásmicas fueron separados en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la tabla 9.

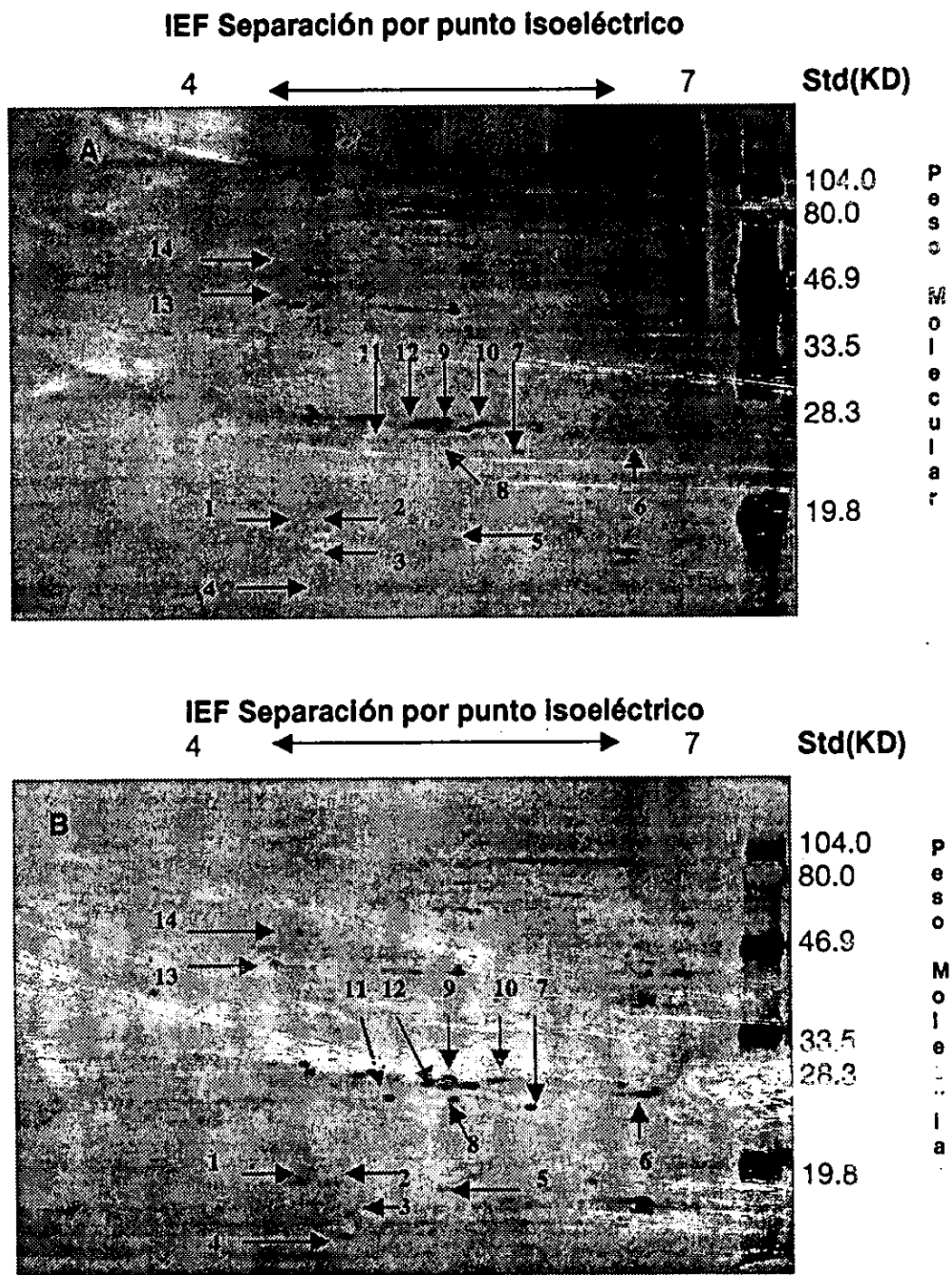
**Tabla 9.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces del maíz que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Acacia cedilloi*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso Molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.16	0.31 (A)*	16.5
2	0.22	1.62 (A)*	28.0
3	0.22	1.62(A)*	27.6
4	0.18	1.36 (A)*	27.0
5	0.23	0.71 (A)*	26.0
6	0.86	1.43 (A)*	39.8
7	0.39	1.43 (A)*	30.3
8	0.39	1.43 (A)*	30.3
9	0.39	0.98 (A)*	43.0
10	0.16	0.89 (A)*	40.4
11	0.17	0.89 (A)*	36.9
12	0.75	0.00 (E)*	57.0
13	0.70	0.00 (E)*	64.8
14	0.13	0.56 (A)*	45.9
15	0.54	0.90 (A)	40.7
16	0.18	0.61 (A)*	48.0
17	0.59	0.89 (A)	49.5
18	0.13	0.76 (A)*	51.0
19	0.70	0.15 (D)*	60.3
20	1.14	2.09 (A)	29.0
21	0.15	0.65 (A)*	26.0

(A)\* Proteínas que aumentaron su absorbancia más del 100% con respecto al control. (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50%. (E)\* proteína desaparecida.

El lixiviado acuoso de *Acacia* no afecta significativamente el crecimiento radicular del maíz, pero sí causó varios cambios en el patrón de las proteínas (Figura 10, Tabla 9). El análisis del escán mostró que la mayoría de las proteínas aumentaron su absorbancia, lo que sugiere que probablemente su síntesis también aumentó. Estas proteínas modificadas (1-11, 14-18, 21) son de bajo y mediano peso molecular; solo la 19 (de mediano peso molecular) disminuyó su absorbancia. Las proteínas 12 y 13 desaparecieron con el tratamiento y son de mediano peso molecular. Aunque la raíz del maíz no fue inhibida, el patrón de proteínas fue fuertemente modificado. Se ha observado que otros tipos de estrés como la temperatura alta y las condiciones anaérobicas también inducen cambios en la síntesis de proteínas en la raíz del maíz (Cooper

y Ho, 1983; Sachs y Ho, 1986; Chang, et al., 2000). En el estrés por temperatura alta, las proteínas inducidas fueron identificadas como proteínas de choque térmico (HSPs). En el caso del estrés anaeróbico, una de las proteínas inducidas, fue identificada como la enzima alcohol deshidrogenasa.



**Figura 11.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de maíz. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sebastiania adenophora* (B). 10  $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la Tabla 10.



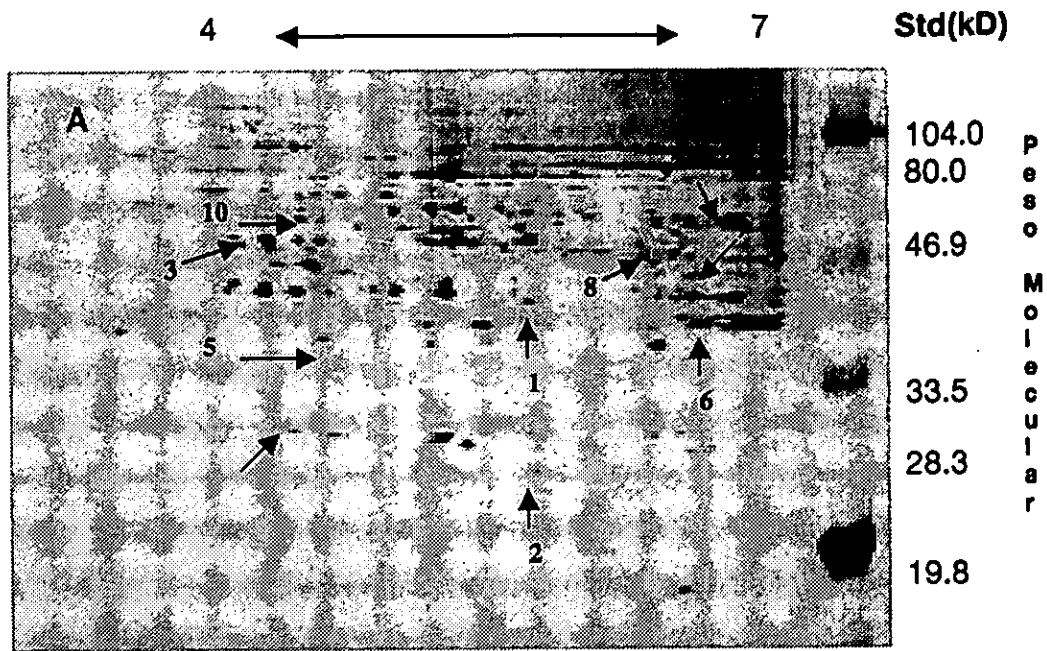
**Tabla 10.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de maíz que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Sebastiania adenophora*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	control	tratamiento	
1	0.17	0.35 (A)*	19.2
2	0.15	0.24 (A)	18.7
3	0.00	0.19 (N)*	16.6
4	0.00	1.20 (N)*	15.2
5	0.00	0.15 (N)*	18.6
6	0.22	1.11 (A)*	28.0
7	0.19	0.98 (A)*	27.0
8	0.15	0.46 (A)*	26.0
9	0.92	1.45 (A)	29.0
10	0.07	0.38 (A)*	29.2
11	0.19	0.78 (A)*	27.5
12	0.33	0.66 (A)*	29.2
13	0.44	0.16 (D)*	47.0
14	0.44	0.15 (D)*	54.6

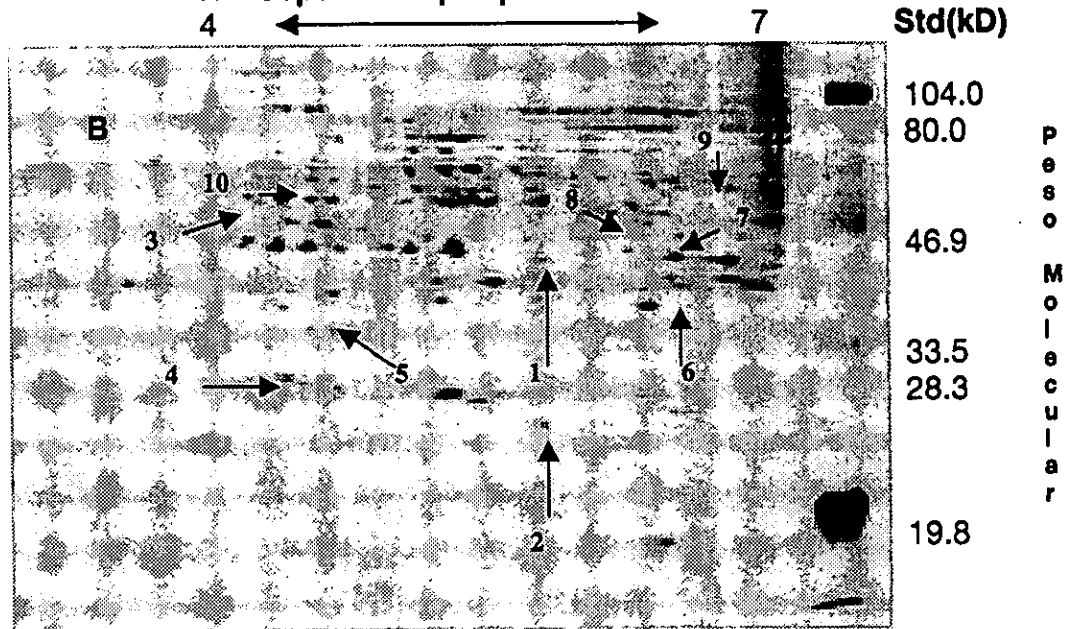
(A)\* proteínas que aumentaron su absorbancia más del 100% con respecto al control, (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50%, (N)\* proteína nueva.

El lixiviado acuoso de *Sebastiania* no afecta significativamente el crecimiento radicular del maíz, pero sí su patrón de proteínas, como se puede apreciar en la Tabla 10. Nueve proteínas aumentaron su absorbancia (1, 2, 6-12), todas ellas de bajo peso molecular. Dos proteínas (13 y 14), de mediano peso molecular, disminuyeron su absorbancia. Además, tres proteínas (3, 4 y 5), de bajo peso molecular, aparecieron con el tratamiento. Es importante hacer mención que estas proteínas no se observaron con *Sicyos*, *Acacia* y *Lantana*. Las proteínas inducidas con el tratamiento de *Sebastiania*, pueden ser proteínas que la planta sintetiza como un mecanismo de tolerancia a este tipo de estrés. Como ya se mencionó, las HSPs ayudan al plegamiento, al transporte, a la remoción o limpieza de proteínas dañadas durante períodos de estrés (Vierling, 1991). Las proteínas 1 y 4 no pudieron ser secuenciadas debido a que su terminal amino estaba bloqueada.

### IEF Separación por punto Isoeléctrico



### IEF Separación por punto Isoeléctrico



**Figura 12.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de maíz. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Lantana* (B). 10 $\mu$ g de proteína citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de maíz que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Lantana* sp.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.65	0.46 (D)	48.8
2	0.23	0.49 (A)*	27.0
3	0.69	0.28 (D)*	57.7
4	0.24	0.41 (A)*	30.0
5	0.16	0.52 (A)*	36.1
6	0.94	0.49 (D)*	44.1
7	0.90	0.37 (D)*	52.2
8	0.92	0.30 (D)	57.7
9	0.54	0.32 (D)*	63.8
10	0.70	0.39 (D)*	57.0

(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control, (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50%.

El lixiviado de *Lantana* no afectó el crecimiento radicular del maíz (Figura 8), pero sí alteró su patrón de proteínas. Siete proteínas (1, 3, 6-10) disminuyeron y tres proteínas (2, 4 y 5) aumentaron significativamente su absorbancia (Tabla 11).

**Tabla 12.** Resumen del efecto de los lixiviados acuosos (1%) de las hojas de *Sicyos deppei*, *Acacia cedilloi*, *Sebastiania adenophora* y *Lantana* sobre el patrón de síntesis de proteínas citoplásmicas de raíces de *Zea mays*.

Plantas alelopáticas	Número de proteínas modificadas por los tratamientos				
	Aumentan (A)	Disminuyen (D)	Desaparecen (E)	Nuevas (N)	Total
<i>Acacia</i>	18	1	2	-	21
<i>Sebastiania</i>	9	2	-	3	14
<i>Lantana</i>	3	7	-	-	10

El lixiviado acuoso de *Acacia* es el que más afecta el patrón de proteínas de las raíces de maíz, seguido por el de *Sebastiania* y el de *Lantana* (Tabla 12). Estos tres lixiviados no tuvieron efecto sobre el crecimiento de la raíz. El de *Sicyos* fue el único que causó una inhibición del 40% sobre el crecimiento radicular, pero no afectó el patrón de proteínas citoplásmicas (Figura 9).

**Tabla 13.** Proteínas extraídas de la raíz de maíz, con pesos moleculares y pI similares, que son afectadas por los diferentes lixiviados.

Proteína kD	pI	<i>Acacia cedilloi</i>	<i>Sebastiania adenophora</i>	<i>Lantana</i>
15.0	5.7	-	N	-
16.0	5.8	-	N	-
18.0	6.1	-	N	-
26.0	6.0	D	A	-
27.0	6.4	A	A	A
28.0	6.8	A	A	-
29.0	6.0	A	A	-
30.0	5.5	A	-	A
57.0	5.5	E	-	D
64.0	5.5	E	-	-

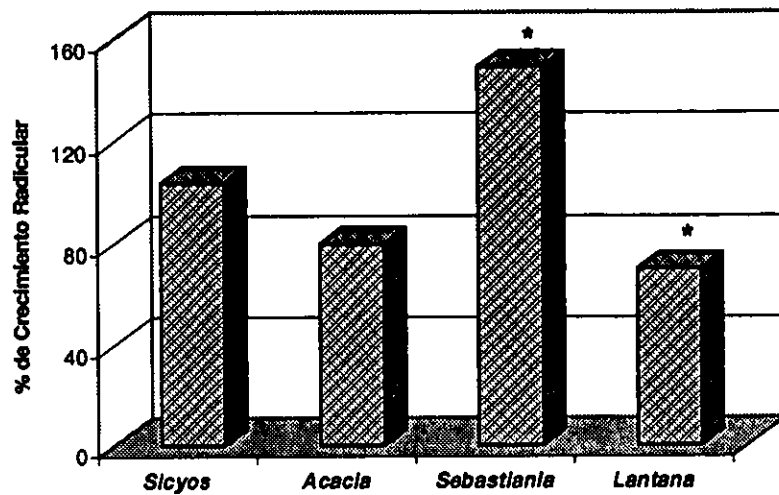
Un resultado interesante fue la aparición de tres proteínas de bajo peso molecular con el tratamiento de *Sebastiania*, (15.2, 16.6 y 18.6 kD) (Figura 11 y Tabla 10)<sup>2</sup>. Una proteína de 26 kD disminuyó con *Acacia* y aumentó con *Sebastiania*. Una de 27 kD aumentó su absorbancia con los lixiviados de *Acacia*, *Sebastiania* y *Lantana*. Las proteínas de 28 kD y de 29 kD aumentaron con *Acacia* y *Sebastiania*. Una de 30 kD aumentó con *Acacia* y *Lantana*. Una de 57 kD desapareció con *Acacia* y disminuyó con *Lantana*. La proteína de 64 kD desapareció con *Acacia*.

Los cambios observados, indican que los lixiviados de las diversas especies afectan de forma distinta al metabolismo del maíz. Es importante considerar que estas alteraciones están determinadas por mezclas de metabolitos en los lixiviados y, como es lógico, estas mezclas tienen diferente naturaleza química. El ensayo *in vitro* de mezclas de compuestos, se acerca a lo que sucede en condiciones naturales; frecuentemente, el efecto biológico de los compuestos químicos producidos y liberados al ambiente por diversos organismos, es un efecto, aditivo o sinérgico, de mezclas complejas. Las cuatro plantas con potencial alelopático pertenecen a distintas familias alejadas taxonómicamente unas de otras, por lo tanto, no podemos suponer que los efectos similares que tuvieron *Acacia* y *Lantana*, aumentando la concentración de una proteína de 30 kD en la raíz del maíz, se deban a que su composición química es semejante. Con seguridad, el tipo de metabolitos que cada una produce, es diferente. Ni *Lantana* ni *Acacia* inhiben el crecimiento de la raíz del maíz, sin embargo, sus lixiviados son capaces de producir un estrés sobre la planta, provocando una alteración en la síntesis de proteínas. Por último, es importante mencionar que el maíz, en relación con el crecimiento de su raíz, es una de las plantas más resistentes a los efectos aleloquímicos de los diferentes lixiviados.

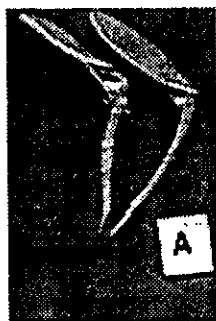
<sup>2</sup> la microsecuenciación de la terminal amino de la proteína de 15.2 kD, no se pudo llevar a cabo por que estaba bloqueada.

### III. EFECTO DE LOS LIXIVIADOS ACUOSOS DE LAS HOJAS SECAS DE *SICYOS*, *ACACIA*, *SEBASTIANIA* Y *LANTANA* SOBRE *CUCURBITA PEPO*

A



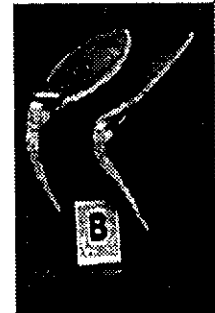
B



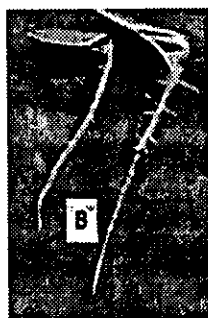
Control



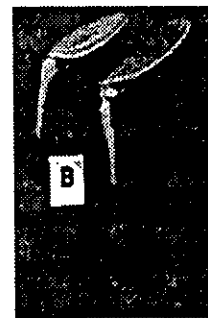
*Sicyos deppeii*



*Acacia cedilloi*



*Sebastiania adenophora*



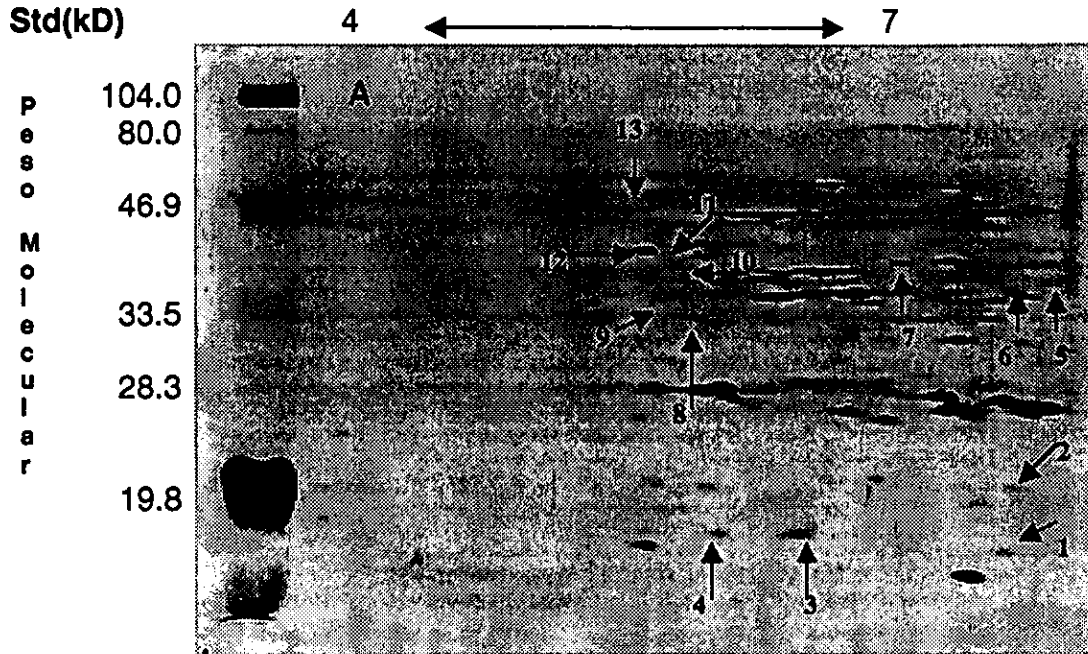
*Lantana*.

**Figura 13 A y B.** Efecto de los lixiviados acuosos de las hojas secas (1%) de las plantas alelopáticas sobre el crecimiento radicular de *Cucurbita pepo* (\*= $p < 0.05$ ). El promedio de crecimiento de las raíces del control fue considerado como el 100%.

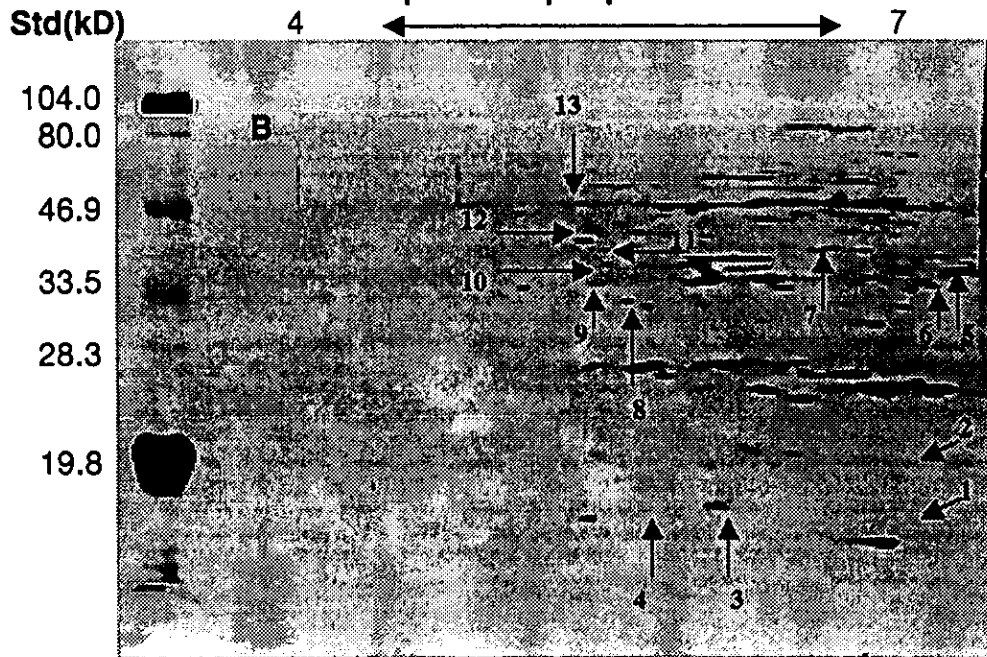
El lixiviado acuoso de *Lantana*. inhibió significativamente el crecimiento de la raíz de calabaza (30%). El de *Sebastiania* lo estimuló un 50%. Los lixiviados de *Acacia* y *Sicyos* no lo afectaron significativamente (Figura 13 A y B).

A continuación se muestran las figuras de los geles de dos dimensiones de las proteínas citoplásmicas (2D-PAGE) de la raíz de calabaza con cada tratamiento, en donde los cambios principales son señalados con flechas y números, tanto en el control (A) como en el tratamiento (B). Las tablas muestran el análisis del scan (XL 2.1) donde se obtuvieron las absorbancias máximas de las proteínas, tanto del control como del tratamiento. Las letras en las tablas indican los cambios en las absorbancias de las proteínas con respecto al control: proteínas que aumentaron (A), disminuyeron (D), desaparecieron (E) y proteínas nuevas (N); también se incluye el peso molecular relativo (kD) de cada proteína.

IEF. Separación por punto Isoeléctrico



IEF. Separación por punto Isoeléctrico



**Figura 14.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de calabaza. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sicyos deppei*. (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los señalados en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de calabaza que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei*.

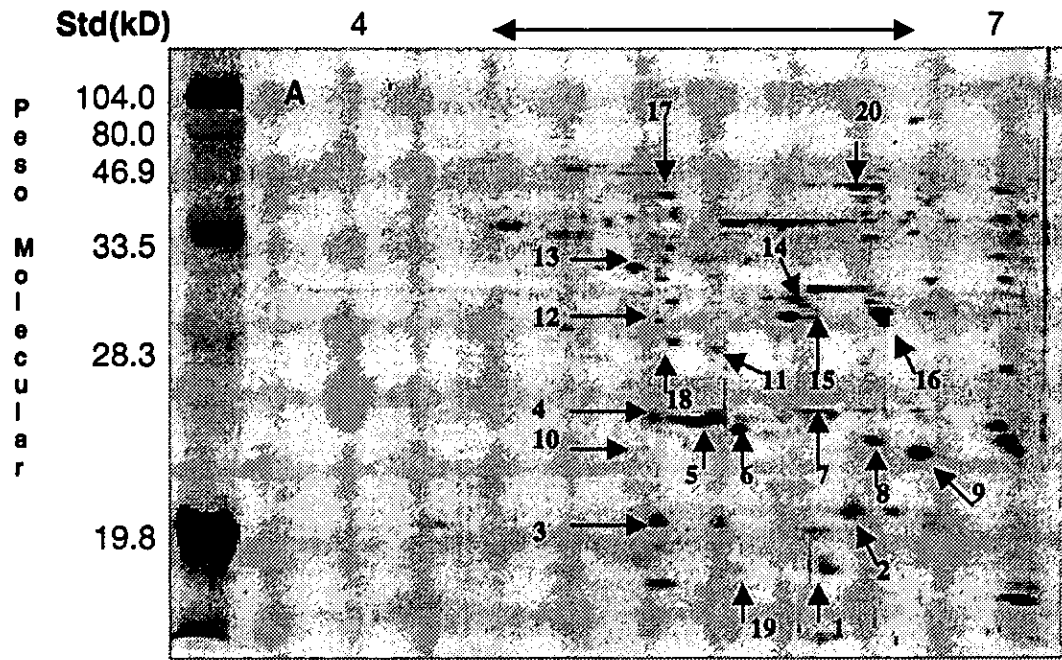
Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.15	0.0 (E)*	11.8
2	0.10	0.0 (E)*	16.5
3	0.50	0.32 (D)	16.0
4	0.13	0.0 (E)*	15.0
5	0.15	0.46 (A)*	41.6
6	0.79	0.45 (D)	38.8
7	0.29	0.16 (D)	34.8
8	0.28	0.47 (A)	39.0
9	0.21	0.42 (A)*	40.0
10	0.21	0.32 (A)	41.6
11	0.21	0.35 (A)	47.0
12	1.21	0.68 (D)	49.0
13	0.19	0.69 (A)*	55.3

(A)\* proteínas que aumentaron su absorbancia más del 100% con respecto al control, (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% y (E)\* proteína que desapareció.

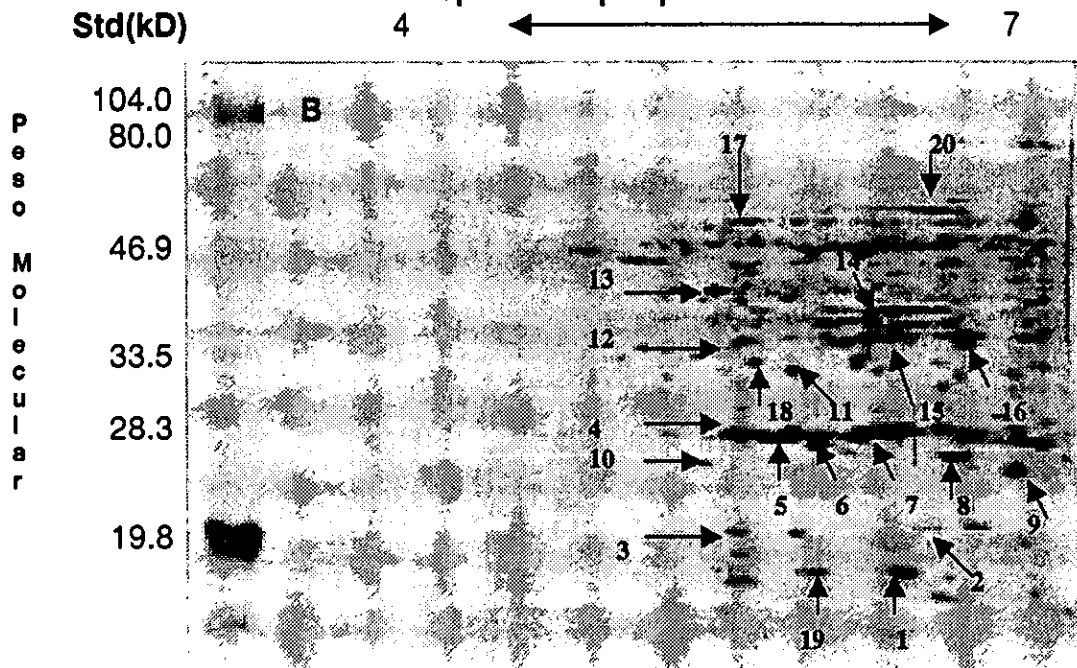
En el caso de la calabaza, el lixiviado de *Sicyos* no alteró el crecimiento radicular, pero sí afectó el patrón de proteínas, como se observa en la Figura 14 y Tabla 14. Tres proteínas de bajo peso molecular (1, 2 y 4), desaparecieron con el tratamiento. Seis proteínas (5, 8-11,13) aumentaron su absorbancia; la 5, 9 y 13, de mediano peso molecular, aumentaron más del 100%. Cuatro proteínas (3, 6, 7 y 12) disminuyeron su absorbancia. Este es un caso muy interesante, ya que la disminución, desaparición y aumento de proteínas nos habla de una respuesta de la planta hacia los metabolitos secundarios del lixiviado de *Sicyos*, aunque no hay una inhibición en el crecimiento de la raíz, los efectos sobre el patrón de proteínas muestran una probable alteración en algún proceso metabólico. Seis proteínas, de las trece que fueron significativamente modificadas, aumentaron su absorbancia; como en los casos anteriores, éstas podrían significar que se han disparado algunos mecanismos de tolerancia al estrés, que ayudan a la planta en circunstancias desfavorables. Las proteínas que disminuyen o desaparecen pueden estar indicando que se ha producido un daño a nivel metabólico de ciertas enzimas (Sachs y Ho, 1986).



### IEF. Separación por punto Isoeléctrico



### IEF. Separación por punto Isoeléctrico



**Figura 15.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de calabaza. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Acacia cedilloi* (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la Tabla 15.

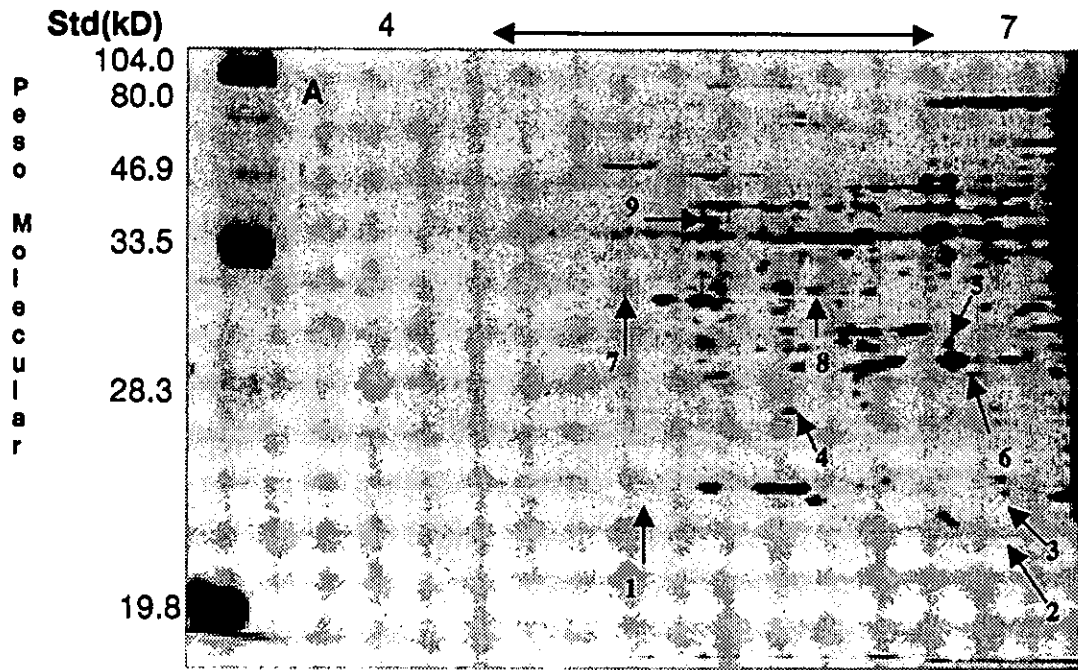
**Tabla 15.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de calabaza que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *A. cedilloi*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.18	1.30 (A)*	16.2
2	0.14	0.12 (D)	19.1
3	0.31	0.15 (D)*	18.5
4	0.21	0.96 (A)*	27.0
5	1.20	2.03 (A)	27.4
6	0.56	1.45 (A)*	26.5
7	0.11	0.89 (A)*	25.0
8	0.60	1.62 (A)*	24.2
9	0.50	0.35 (D)	22.0
10	0.17	0.46 (A)*	24.2
11	0.12	0.63 (A)*	34.5
12	0.13	0.76 (A)*	38.1
13	0.38	0.61 (A)	49.0
14	0.22	0.50 (A)	42.0
15	1.29	1.61 (A)*	46.4
16	0.14	0.53 (A)	38.0
17	0.33	0.89 (A)*	63.0
18	0.18	0.57 (A)*	39.0
19	0.76	1.11 (A)	15.7

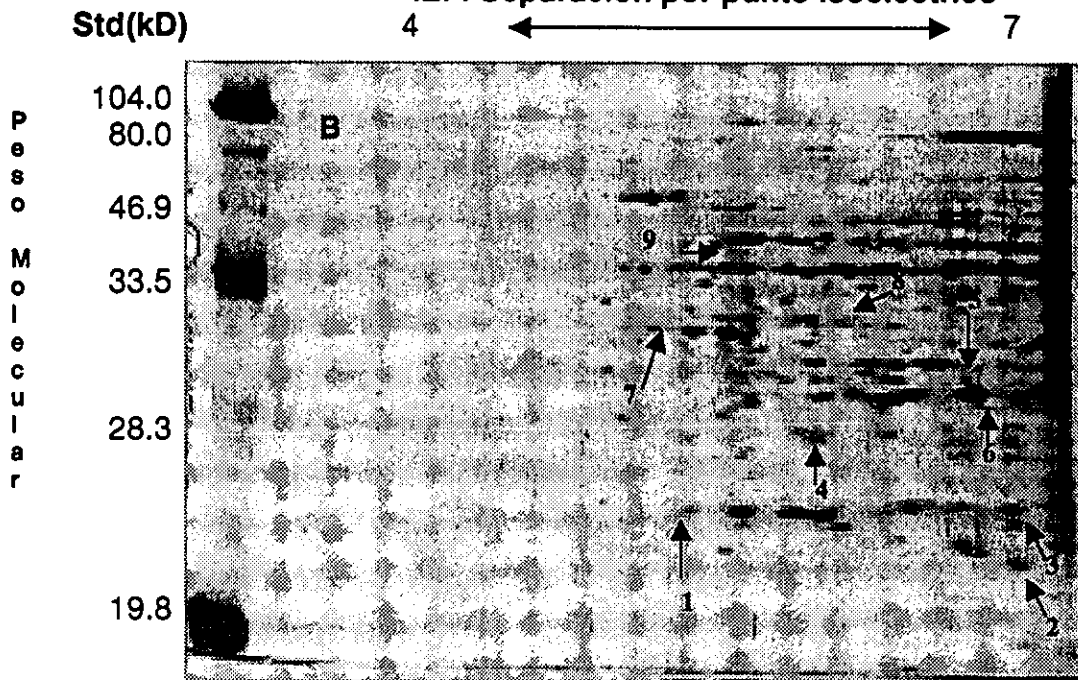
(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control, (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50%.

Como en los casos anteriores, el lixiviado de *Acacia* no tuvo efectos significativos sobre el crecimiento de la raíz de calabaza, y sin embargo modificó severamente el patrón de proteínas (Figura 15). De las 19 proteínas alteradas, 16 aumentaron su absorbancia significativamente, la mayoría de bajo y mediano peso molecular. Este aumento sugiere que tanto la calabaza como el maíz, pueden estar mostrando un mecanismo de tolerancia hacia los metabolitos secundarios presentes en el lixiviado de *Acacia*. La proteína 3 de 18.5 kD, la cual disminuyó, se envió a secuenciar y se lograron identificar once aminoácidos de su terminal amino: LPADVVGYPNXY; esta secuencia mostró similitud con las secuencias de proteínas de estrés térmico de la clase II, por ejemplo, una proteína de 17.4 kD de soya, una de 17.6 kD de *Arabidopsis* y una de 18.8 kD de *Ipomoea ni*, que como puede observarse, poseen un peso molecular similar. Esto indica que probablemente la proteína 3 sea una proteína de estrés térmico constitutiva, cuya síntesis fue afectada por el lixiviado de *Acacia*.

### IEF. Separación por punto Isoeléctrico



### IEF. Separación por punto Isoeléctrico



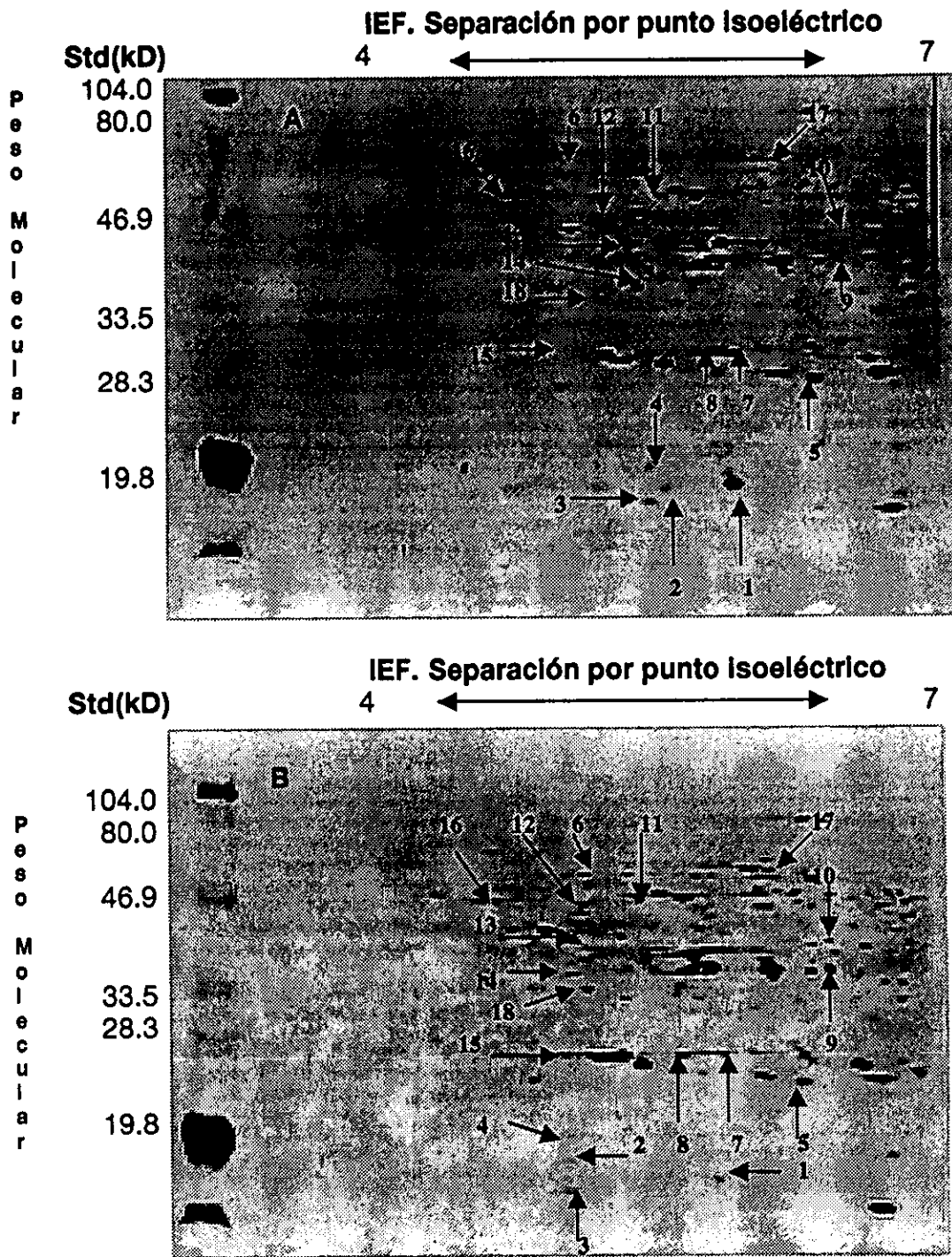
**Figura 16.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de calabaza. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sebastiania adenophora* (B). 10  $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de calabaza que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Sebastiania adenophora*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	control	tratamiento	
1	0.20	0.33 (A)	26.3
2	0.17	0.41 (A)*	22.0
3	0.15	0.51 (A)*	25.6
4	0.54	0.32 (D)	28.0
5	0.60	0.42 (D)	39.0
6	0.53	0.36 (D)	37.8
7	0.12	0.40 (A)*	44.0
8	0.42	0.13 (D)*	45.4
9	0.33	0.13 (D)*	56.1

(A)\* Proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control y (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50%.

El lixiviado de *Sebastiania* estimuló significativamente el crecimiento radicular de la calabaza (50%, Figura 13) y modificó 9 proteínas citoplásmicas de la raíz (Figura 16 y Tabla 16). Cuatro proteínas (1-3 y 7) aumentaron su absorbancia, tres son de bajo peso molecular (1,2 y 3) y una de mediano peso molecular (7). Cinco proteínas disminuyeron (4-6, 8 y 9), las más significativas fueron de mediano peso molecular (8 y 9). Como sabemos, el efecto de los aleloquímicos sobre el crecimiento de la planta receptora, puede ser inhibitorio o estimulante (Rice 1984); en este caso, los aleloquímicos contenidos en el lixiviado de *Sebastiania* producen una estimulación del 50% sobre el crecimiento de la raíz de calabaza, y además, afectan significativamente el patrón de proteínas citoplásmicas.



**Figura 17.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de calabaza. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Lantana*. (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los indicados en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de calabaza que presentaron los principales cambios, tanto del control como de las tratadas con el lixiviado acuoso de *Lantana*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	1.03	0.12 (D)*	16.0
2	0.13	0.0 (E)*	17.7
3	0.44	0.10 (D)*	15.0
4	0.10	0.0 (E)*	18.9
5	0.51	0.20 (D)*	22.0
6	0.10	0.61 (A)*	63.0
7	1.02	0.37 (D)*	28.4
8	0.10	0.38 (A)*	25.2
9	0.14	0.30 (A)*	41.2
10	0.20	0.57 (A)*	48.8
11	0.22	0.57 (A)*	66.3
12	0.09	0.40 (A)*	52.3
13	0.10	0.58 (A)*	47.2
14	0.13	0.71 (A)*	39.9
15	0.06	0.48 (A)*	27.5
16	0.13	0.29 (A)*	65.2
17	0.46	1.01 (A)*	66.3
18	0.40	1.25 (A)*	39.2

(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control, (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% y (E)\* proteína que desapareció.

El lixiviado acuoso de las hojas de *Lantana* fue el único tratamiento que inhibió significativamente (30%) el crecimiento radicular de la calabaza (Figura 13), además de modificar la expresión de 18 proteínas citoplásmicas (Figura 17). Dos proteínas (2 y 4) desaparecieron con el tratamiento y son de bajo peso molecular. Cuatro proteínas (1, 3, 5 y 7), de bajo peso molecular, disminuyeron su absorbancia, y doce proteínas la aumentaron (6, 8-18), tres son de bajo peso molecular (6, 8 y 15) y las restantes de alto peso molecular (Tabla 17). El aumento de la absorbancia de las proteínas, no necesariamente significa que se está disparando un mecanismo de tolerancia al estrés aleloquímico producido por los metabolitos secundarios de *Lantana*; este aumento puede deberse a otro tipo de alteración metabólica, que a su vez, modifica el patrón de síntesis de proteínas.

**Tabla 18.** Resumen del efecto de los lixiviados acuosos (1%) de las hojas de *Sicyos deppei*, *Acacia cedilloi*, *Sebastiania adenophora* y *Lantana* sobre el patrón de síntesis de proteínas citoplásmicas de las raíces de *Cucurbita pepo*.

Plantas alelopáticas	NÚMERO DE PROTEÍNAS MODIFICADAS POR LOS TRATAMIENTOS			
	Aumentan (A)	Disminuyen (D)	Desaparecen (E)	Total
<i>Sicyos</i>	6	4	3	13
<i>Acacia</i>	16	3	-	19
<i>Sebastiania</i>	4	5	-	9
<i>Lantana</i>	12	4	2	18

Los lixiviados de *Acacia* y *Lantana* fueron los que causaron más cambios en el patrón de proteínas, siendo *Lantana*, el que más inhibió el crecimiento radicular de la calabaza (Figura 13). En cambio, el tratamiento con *Sebastiania* lo estimuló significativamente y fue el que menos afectó el patrón de proteínas de esta planta.

**Tabla 19.** Proteínas de la calabaza, con pesos moleculares y pl similares, que son afectadas por los diferentes tratamientos.

Proteína (kD)	pl	<i>Sicyos deppei</i>	<i>Acacia cedilloi</i>	<i>Sebastiania adenophora</i>	<i>Lantana</i>
15.0	6.0	E	A	-	D
16.0	6.2	D	A	-	D
22.0	6.6	-	D	A	D
25.0	6.2	-	A	-	A
27.0	5.7	-	A	-	A
39.0	6.0	A	A	-	A
40.0	5.9	A	A	-	A
47.0	5.9	A	-	-	A
49.0	5.8	D	A	-	-
63.0	6.7	-	A	-	A

Podemos observar que en las raíces de calabaza, la proteína de 15 kD desapareció con *Sicyos*, aumentó con *Acacia* y disminuyó con *Lantana*. La proteína de 16 kD disminuyó con *Sicyos* y *Lantana*, y aumentó con *Acacia*. La proteína de 22 kD disminuyó con *Acacia* y *Lantana*, y aumentó con *Sebastiania*. Las proteínas de 25 y 27 kD aumentaron con *Acacia* y *Lantana*. Las proteínas de 39 y 40 kD aumentaron su absorbancia con *Sicyos*, *Acacia* y *Lantana*. Una proteína de 47 kD aumentó con *Sicyos* y *Lantana*. La proteína de 49 kD disminuyó con *Sicyos* y aumentó con *Acacia*. La proteína de 63 kD aumentó con *Acacia* y *Lantana*.

IV. EFECTO DE LOS LIXIVIADOS ACUOSOS DE LAS HOJAS SECAS DE *SICYOS*, *ACACIA*, *SEBASTIANA* Y *LANTANA* SOBRE *LYCOPERSICON ESCULENTUM*

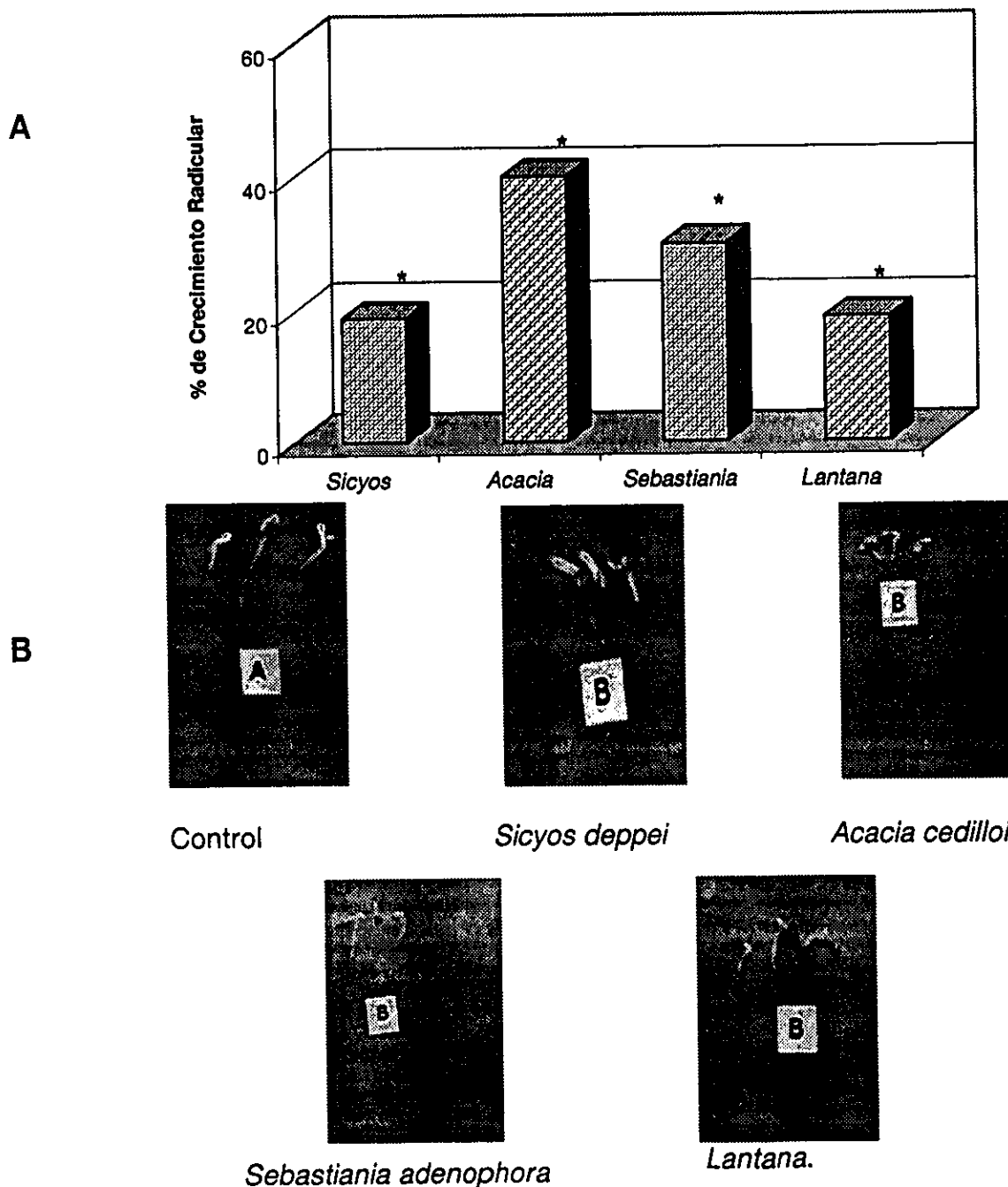
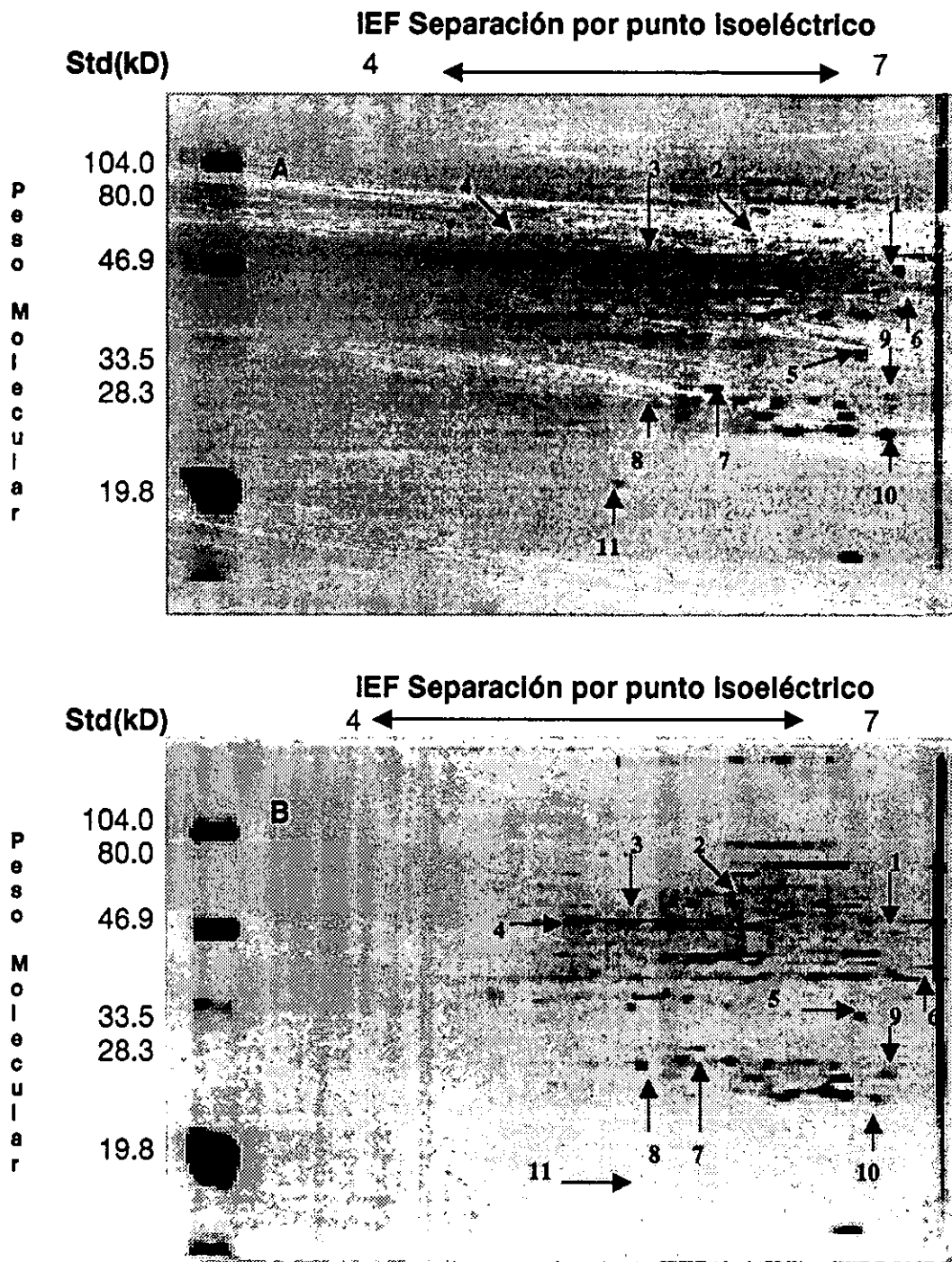


Figura 18 A y B. Efecto de los lixiviados acuosos de las hojas secas (1%) de las plantas alelopáticas sobre el crecimiento radicular de *Lycopersicon esculentum* (\*=  $p < 0.05$ ). El promedio de crecimiento de las raíces del control fue considerado como el 100%.



Los lixiviados acuosos de todas las especies, inhibieron significativamente el crecimiento de la raíz de jitomate. El de *Sicyos* y *Lantana* lo inhibieron un 81%, el de *Sebastiania* un 70 % y el de *Acacia* un 60%. El jitomate fue la especie de prueba más sensible a los tratamientos (Figura 18 A y B).

A continuación se muestran las figuras de los geles de dos dimensiones de las proteínas citoplásmicas (2D-PAGE) de cada tratamiento, en donde los cambios principales son señalados con flechas y números tanto en el control (A) como en el tratamiento (B). La tablas muestran el análisis del escán (XL 2.1) donde se obtienen las absorbancias máximas de las proteínas, tanto del control como del tratamiento. Las letras en las tablas indican los cambios en las absorbancias de las proteínas con respecto al control: proteínas que aumentaron (A), disminuyeron (D), desaparecieron (E) y proteínas nuevas (N); también se incluye el peso molecular relativo (kD) de cada proteína.



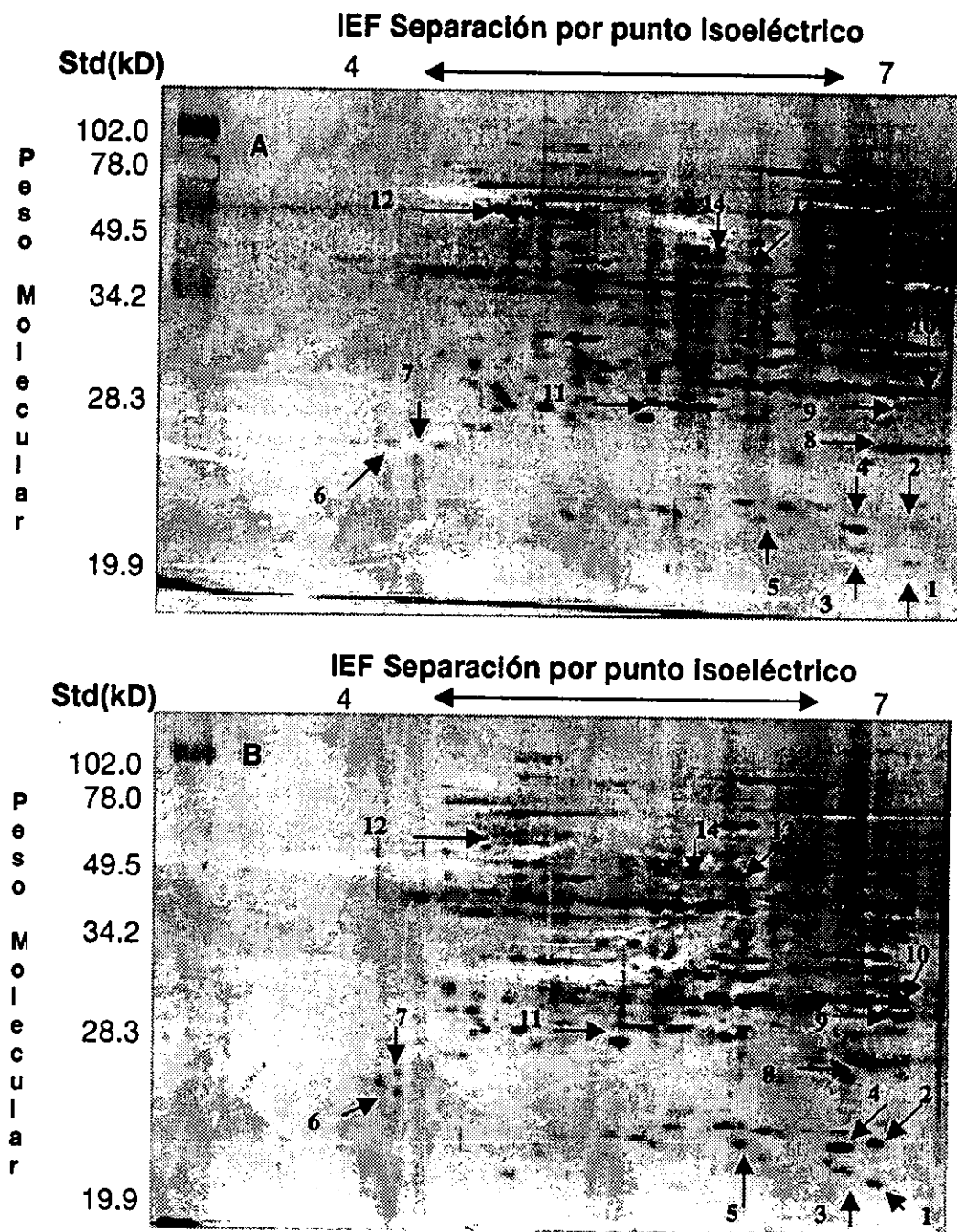
**Figura 19.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de jitomate. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *S. deppiei*. (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están indicados con flechas y números que corresponden a los efectos señalados en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de jitomate que presentaron los principales cambios, tanto del control como del tratamiento con el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.81	0.17 (D)*	51.0
2	0.18	0.52 (A)*	62.5
3	0.28	0.52 (A)	58.4
4	0.45	0.19 (D)	58.4
5	0.71	0.18 (D)*	34.0
6	0.26	0.48 (A)	46.0
7	0.59	0.26 (D)*	30.0
8	0.25	0.62 (A)*	26.7
9	0.28	0.18 (D)	26.7
10	0.46	0.19 (D)*	23.0
11	0.13	0.0 (E)*	17.0

(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control. (D)\* las proteínas disminuyeron más del 50% y (E)\* proteína desaparecida.

Aunque el lixiviado de *Sicyos* inhibió un 81 % el crecimiento radicular del jitomate, sólo 11 proteínas citoplásmicas fueron modificadas por este tratamiento. Es importante hacer notar que los resultados con jitomate son contrarios a los obtenidos con el frijol, pues aunque *Sicyos* también inhibió el 70% su crecimiento radicular, como ya se mencionó, el patrón de síntesis de proteínas no fue tan modificado (Figura 3 y Tabla 2). En el caso del jitomate, cuatro proteínas (2, 3, 6, 8) aumentaron su absorbancia, una de bajo peso molecular (8) y las restantes de mediano peso molecular. Seis proteínas (1, 4, 5, 7, 9 y 10) disminuyeron, tres de mediano (1, 3 y 5) y tres de bajo peso molecular (7, 9 y 10). Una proteína (11) de bajo peso molecular, desapareció con el tratamiento (Figura 19).



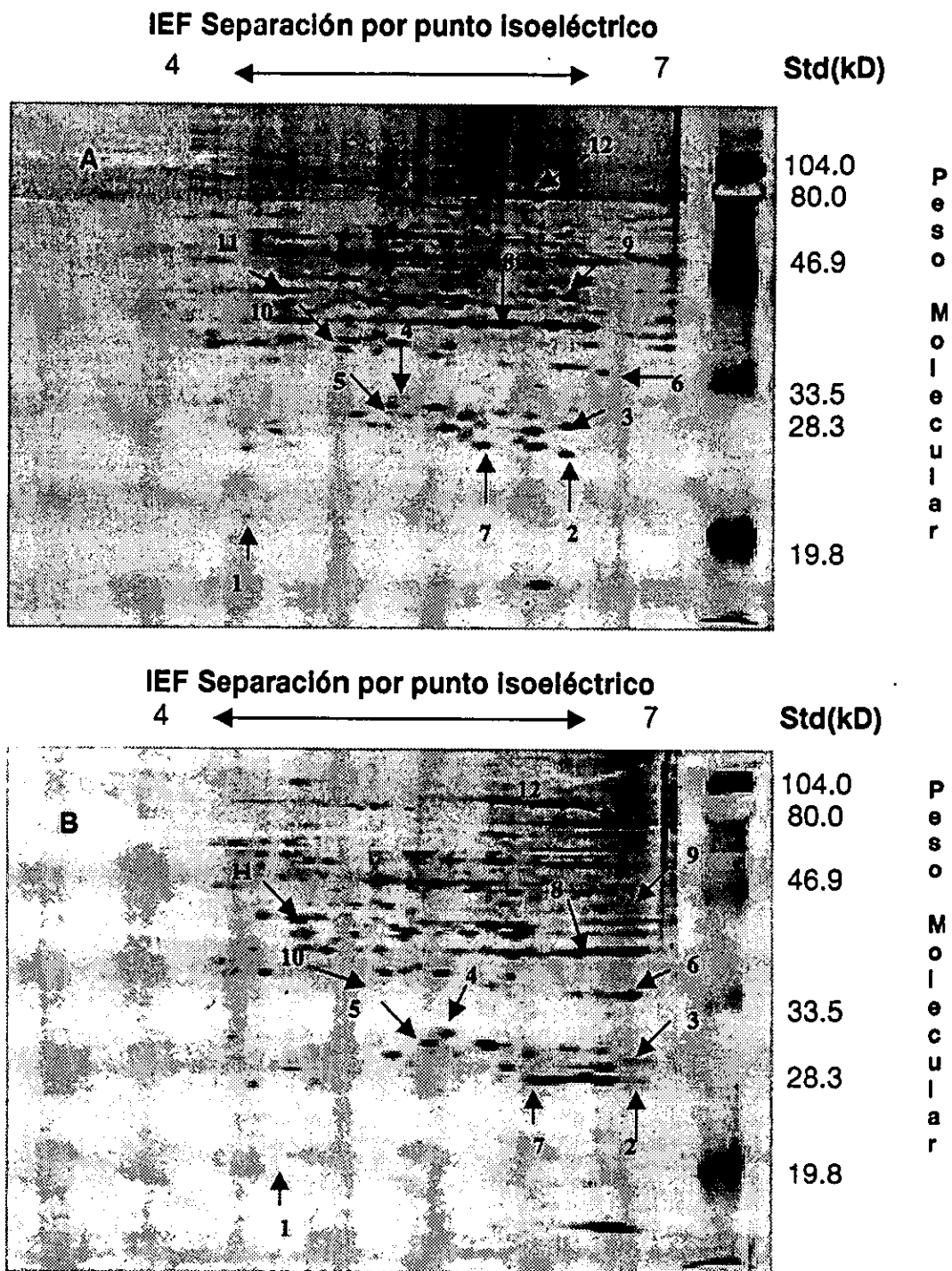
**Figura 20.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de jitomate. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Acacia cedilloi*. (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están indicados con flechas y números que corresponden a los efectos señalados en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de jitomate que presentaron los principales cambios, tanto del control como del tratamiento con el lixiviado acuoso de *Acacia cedilloi*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.30	0.57 (A)*	21.7
2	0.36	0.63 (A)	24.7
3	0.43	0.55 (A)	25.0
4	0.75	1.06 (A)	24.7
5	0.43	0.63 (A)	27.0
6	0.23	0.50 (A)*	30.4
7	0.32	0.46 (A)	31.2
8	0.48	0.72 (A)	34.0
9	0.0	0.44 (N)*	38.5
10	0.16	1.30 (A)*	35.8
11	0.56	0.78 (A)	37.5
12	0.47	0.0 (E)*	70.0
13	0.58	0.80 (A)	62.2
14	0.69	0.98 (A)	62.2

(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control, (N)\* proteína nueva y (E)\* proteína desaparecida.

El lixiviado de *Acacia* inhibió significativamente el crecimiento radicular del jitomate (60%) y afectó la concentración de 14 proteínas citoplásmicas (Tabla 21). Doce proteínas (1-8, 10, 11, 13, 14) de bajo y mediano peso molecular, aumentaron su absorbancia. Una proteína de mediano peso molecular (9) apareció con el tratamiento, y una proteína de alto peso molecular (12) desapareció con el tratamiento (Figura 20). Ben-Hayyim y colaboradores (1989), compararon el patrón de proteínas de líneas celulares de *Lycopersicon* y de *Citrus sinensis* L, adaptadas y no adaptadas al NaCl. Estos autores observaron que en las líneas adaptadas a la salinidad, la síntesis de algunas proteínas se inhibía en *C. sinensis*, mientras que en el jitomate se incrementaba. Los autores sugieren que los cambios en la síntesis de proteínas, son específicos en cada una de las especies.



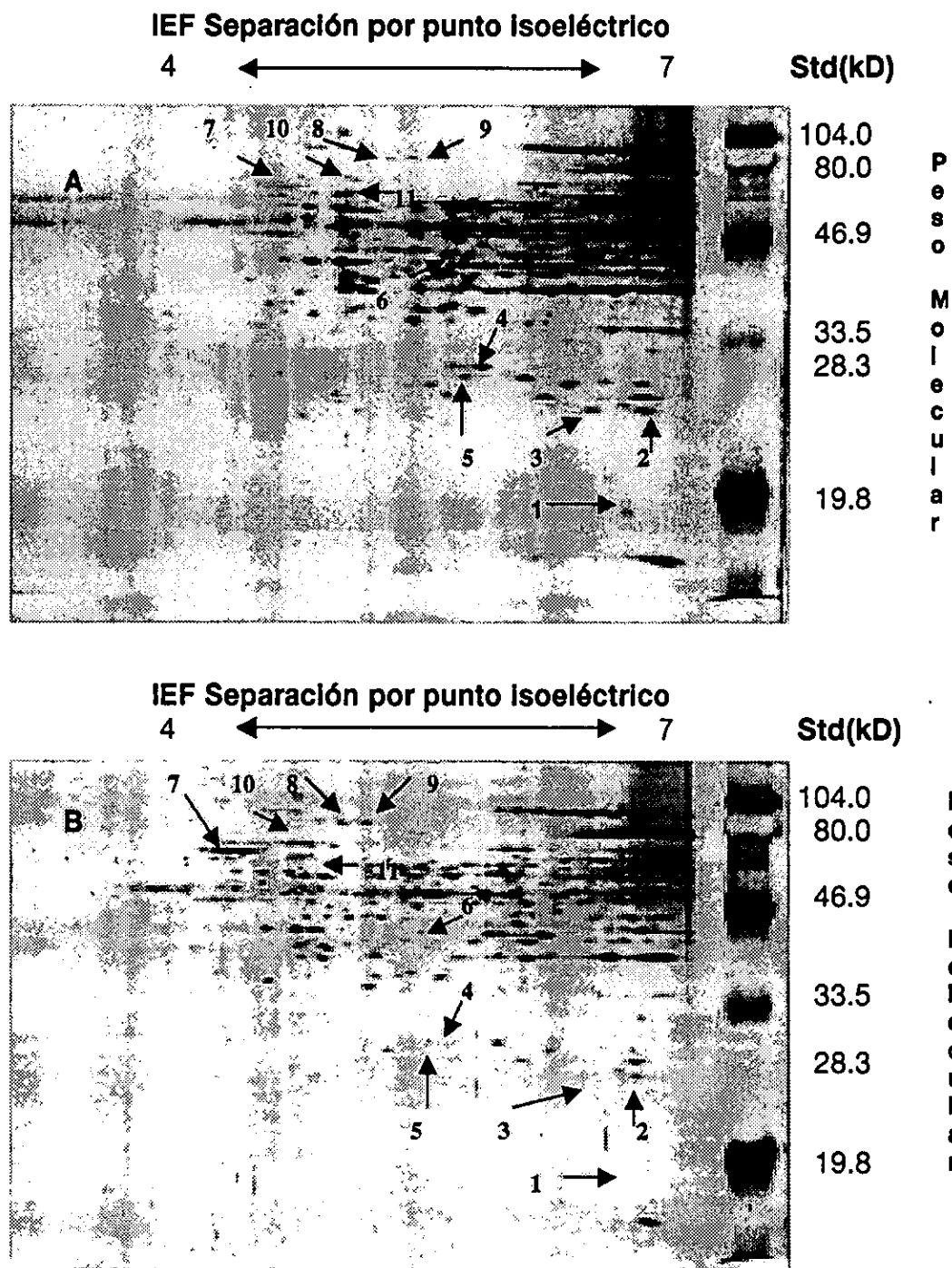
**Figura 21.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de jitomate. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Sebastiania adenophora* (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están indicados con flechas y números que corresponden a los efectos señalados en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de jitomate que presentaron los principales cambios, tanto del control como del tratamiento con el lixiviado acuoso de *Sebastiania adenophora*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.93	0.0 (E)*	17.2
2	0.88	0.34 (D)*	23.0
3	0.83	0.20 (D)*	27.5
4	0.20	0.61 (A)*	30.5
5	0.17	0.48 (A)*	29.0
6	0.42	0.76 (A)	34.0
7	0.60	1.29 (A)*	26.0
8	1.57	0.87 (D)	42.7
9	1.45	0.23 (D)*	52.2
10	0.68	0.20 (D)*	36.1
11	1.11	0.40 (D)*	48.8
12	1.74	0.75 (D)*	73.2

(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control. (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% y (E)\* proteína desaparecida.

El lixiviado de *Sebastiania* inhibió el crecimiento radicular del jitomate (70 %) (Figura 18) y afectó la absorbancia de 12 proteínas citoplásmicas (Figura 21 y Tabla 22), las cuales disminuyeron con el tratamiento de *Sebastiania*. Siete proteínas disminuyeron, dos de bajo peso molecular (2 y 3), cuatro de mediano peso molecular (8-11) y una de alto peso molecular (12). Cuatro proteínas de bajo peso molecular (4-7), aumentaron su absorbancia, y una proteína (1) desapareció (Figura 21 y Tabla 22). Así pues, el crecimiento radicular del jitomate se inhibió significativamente con el lixiviado de *Sebastiania*, el cual también afectó el patrón de síntesis de proteínas. Los resultados indican que muchos de los cambios en la expresión de proteínas que resultan de los efectos del lixiviado de *Sebastiania*, probablemente indican que el metabolismo celular está siendo afectado, y esto da como resultado que la síntesis de algunas proteínas aumente o disminuya. Como hemos mencionado anteriormente, existen ejemplos en la literatura que hablan de la modificación en el patrón de proteínas cuando las plantas son sometidas a un estrés (biótico o abiótico). Por ejemplo en un estudio de proteínas microsomales y citoplásmicas de raíz de trigo sometidas a un estrés de aluminio, se observó que los principales cambios fueron en las proteínas citoplásmicas (Ownby y Hruschka, 1991), donde muchas aumentaron, disminuyeron o bien desaparecieron por efecto del aluminio.



**Figura 22.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de jitomate. Control (A) y tratamiento con el lixiviado de *Lantana*. (B). 10 $\mu$ g de proteínas citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están indicados con flechas y números que corresponden a los efectos señalados en la Tabla 23.

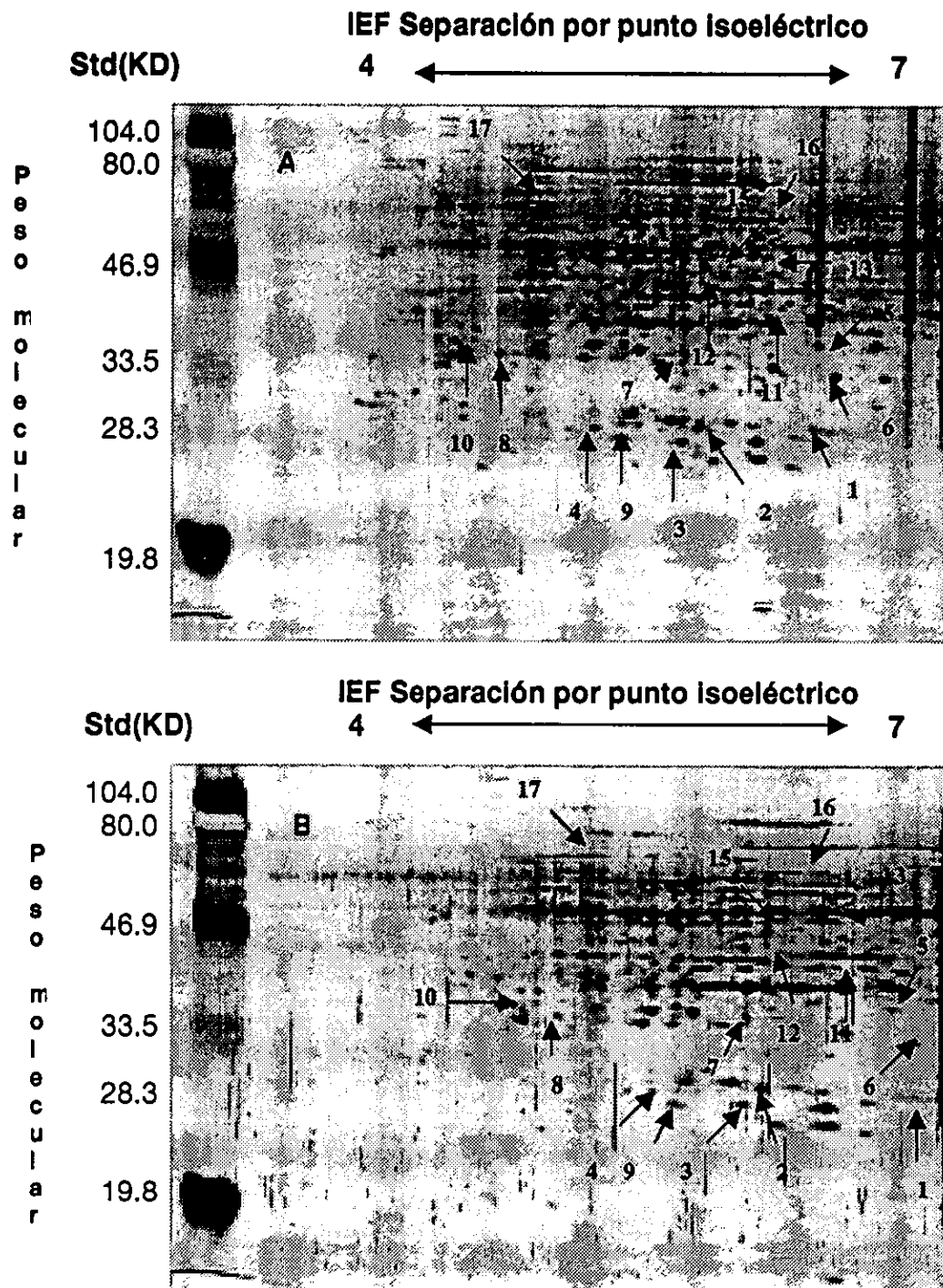


**Tabla 23.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas citoplásmicas extraídas de las raíces de jitomate que presentaron los principales cambios, tanto del control como del tratamiento con el lixiviado acuoso de *Lantana*.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Tratamiento	
1	0.30	0.70 (A)*	17.2
2	0.63	1.15 (A)	25.0
3	0.24	0.58 (A)*	26.7
4	0.24	1.30 (A)*	30.3
5	0.28	0.86 (A)*	29.0
6	0.25	1.54 (A)*	51.6
7	1.64	0.20 (D)*	70.0
8	1.08	0.49 (D)*	77.6
9	1.86	0.26 (D)*	77.6
10	0.98	0.23 (D)*	73.0
11	1.76	0.70 (D)*	66.3

(A)\* proteínas que aumentaron más del 100% su absorbancia con respecto al control. (D)\* proteínas que disminuyeron más del 50%.

Los efectos del lixiviado de *Lantana* sobre el patrón de proteínas en la raíz de jitomate, fueron diversos (Tabla 23). Seis proteínas de bajo y mediano peso molecular (1-6) aumentaron. Cinco proteínas disminuyeron, dos de mediano peso molecular (7 y 11) y tres de alto peso molecular (8-10). El lixiviado de *Lantana* fue uno de los tratamientos que más inhibió el crecimiento radicular del jitomate (81%) y también fue el que más afectó su patrón de proteínas, principalmente las de alto peso molecular. Este aumento y disminución de las proteínas, es la respuesta particular del jitomate a los efectos de los aleloquímicos presentes en el lixiviado de *Lantana*.



**Figura 23.** 2D-PAGE de proteínas citoplásmicas extraídas de raíces de jitomate. Control (A) y tratamiento con el herbicida "Alaclor" a 100 ppm (B). 10 $\mu$ g de proteína citoplásmicas fueron separadas en cada gel. Los cambios principales están señalados con flechas y números que corresponden a los efectos señalados en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Absorbancias máximas y pesos moleculares relativos (kD) de las proteínas extraídas de las raíces de jitomate que presentaron los principales cambios, tanto del control como del tratamiento con el herbicida “alacior” a 100 ppm.

Número de proteína	Absorbancia máxima de proteínas		Peso molecular relativo (kD)
	Control	Herbicida	
1	0.52	0.0 (E)*	28.7
2	1.26	0.40 (D)*	29.1
3	1.06	0.67 (D)	27.0
4	0.88	0.53 (D)	28.7
5	0.93	0.36 (D)*	40.0
6	1.58	0.51 (D)*	35.8
7	1.39	0.24 (D)*	39.0
8	1.65	0.53 (D)*	39.0
9	0.63	0.30 (D)*	29.0
10	0.63	0.30 (D)*	41.1
11	1.80	0.14 (D)*	47.2
12	0.64	0.09 (D)*	48.5
13	0.79	0.39 (D)*	58.0
14	1.04	0.29 (D)*	52.7
15	0.64	0.05 (D)*	58.0
16	1.33	0.33 (D)*	65.6
17	0.93	0.51 (D)*	73.3

(D)\* proteínas que disminuyeron más del 50% con respecto al control, (E)\* proteína desaparecida.

El herbicida “Alacior” afectó significativamente el patrón de proteínas del jitomate, disminuyendo la absorbancia de casi todas las proteínas (2-17) de bajo, mediano y alto peso molecular hasta un 90%; la proteína (1), de bajo peso molecular (28.7 kD), desapareció con el herbicida. El modo como el herbicida afectó el patrón de proteínas es distinto al de los lixiviados, pues las proteínas afectadas fueron diferentes.

**Tabla 25.** Resumen del efecto de los lixiviados acuosos (1%) de las hojas secas de *Sicyos deppei*, *Acacia cedilloi*, *Sebastiania adenophora*, *Lantana* y el herbicida sobre el patrón de síntesis de proteínas citoplásmicas de raíces de *Lycopersicon esculentum*.

Plantas alelopáticas	NÚMERO DE PROTEÍNAS MODIFICADAS POR LOS TRATAMIENTOS				
	Aumentan (A)	Disminuyen (D)	Desaparecen (E)	Nuevas (N)	Total
<i>Sicyos</i>	4	6	1	-	11
<i>Acacia</i>	12	-	1	1	14
<i>Sebastiania</i>	4	7	1	-	12
<i>Lantana</i>	6	5	-	-	11
Herbicida		15	1		17

Aunque el jitomate fue la planta de prueba cuyo crecimiento radicular se inhibió muy significativamente por los lixiviados de las plantas alelopáticas, el patrón de proteínas citoplásmicas no se afectó tanto como el del maíz o la calabaza, aunque sí presentó cambios interesantes. El lixiviado de *Acacia* es el que mayor número de proteínas modificó (Figura 20). Los lixiviados de *Sicyos*, *Sebastiania* y *Lantana* fueron los tratamientos que más afectaron al jitomate y a la síntesis de proteínas en el mismo, aunque de manera diferenciada.

**Tabla 26.** Proteínas de *Lycopersicon esculentum*, con pesos moleculares y pI similares, que son afectadas por los diferentes lixiviados y el herbicida.

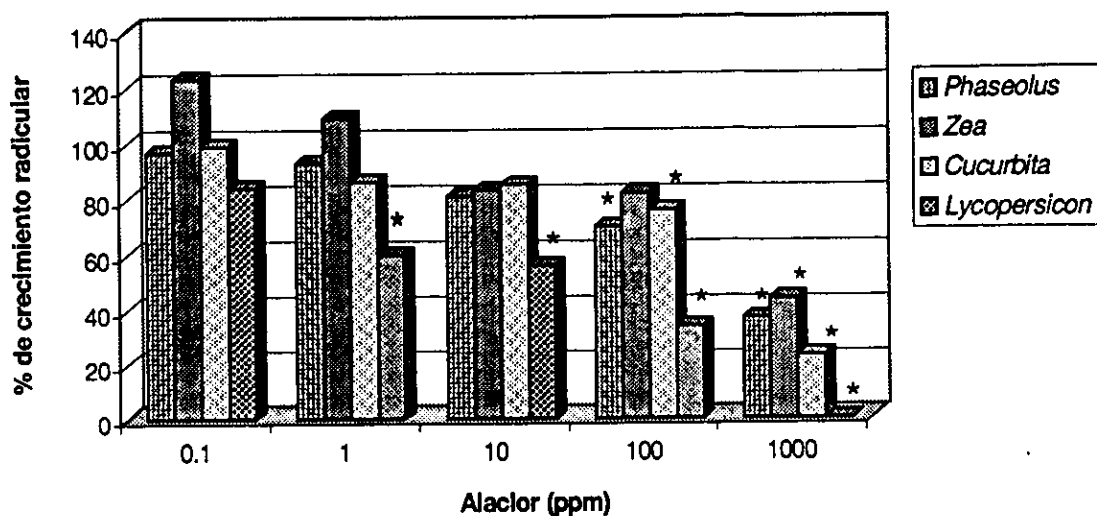
Proteína (kD)	pI	<i>Sicyos deppei</i>	<i>Acacia cedilloi</i>	<i>Sebastiania adenophora</i>	<i>Lantana</i>	Herbicida
17.0	6.0	E	-	E	-	-
23.0	7.0	D	-	D	-	-
25.0	6.8	-	A	-	A	-
26.0	6.7	-	-	A	A	-
27.0	6.6		A			D
29.0	6.2	-	-	A	A	D
30.0	6.3	D	-	A	A	-
34.0	6.9	D	A	A	-	
38.5	7.0	-	N	-	-	D
70.0	5.5	-	E	-	D	-
73.0	5.7				D	D

Con los tratamientos de *Sicyos* y *Sebastiania*, la proteína de 17 kD desapareció y la de 23 kD disminuyó con *Sicyos*. La proteína de 25 kD aumentó con *Acacia* y *Lantana*. Los tratamientos de *Sebastiania* y *Lantana* aumentaron las proteínas de 26 kD y de 29 kD. La proteína de 27 kD aumentó con *Acacia* y disminuyó con el herbicida. La proteína de 29 kD aumentó con *Sebastiania* y *Lantana* y disminuyó con el herbicida. La proteína de 30 kD disminuyó con *Sicyos* pero

aumentó con *Sebastiania* y *Lantana*. La proteína de 34 kD disminuyó con *Sicyos* pero aumentó con *Acacia* y *Sebsatiania*. La proteína de 70 kD desapareció con *Acacia* y disminuyó con *Lantana*. La proteína de 73 kD disminuyó con *Lantana* y el herbicida

Como comentario general a los resultados presentados, se puede señalar que las alteraciones en el patrón de proteínas se observaron tanto en aquellas proteínas con peso molecular bajo, mediano y alto. Las proteínas que aumentaron o aparecieron con los distintos tratamientos, probablemente están relacionadas con algunos mecanismos de defensa o de adaptación de las plantas al estrés aleloquímico.

V. CRECIMIENTO RADICULAR DE LAS PLANTAS CULTIVADAS TRATADAS CON EL HERBICIDA ALACLOR A CINCO CONCENTRACIONES.



**Figura 24.** Efecto del herbicida "alaclor" a diferentes concentraciones sobre el crecimiento radicular de frijol, maíz, calabaza y jitomate. El promedio de crecimiento de las raíces del control fue considerado como el 100%.

En la figura 24 se observa que el jitomate es la única planta cuyo crecimiento radicular fue inhibido (40-100%) por las concentraciones de 1.0, 10, 100 y 1000 ppm. Por el contrario, el maíz fue la planta más resistente al herbicida, porque su crecimiento radicular se inhibió significativamente sólo con la concentración más alta (1000 ppm). El crecimiento radicular del frijol y la calabaza fue inhibido significativamente a 100 y 1000 ppm.

## DISCUSIÓN

Los mecanismos de acción de los compuestos aleloquímicos, pueden ser estudiados a través del análisis de diversos procesos fisiológicos por separado, como por ejemplo, el efecto de éstos compuestos sobre la división celular, fotosíntesis, respiración, entre otros. El proceso de síntesis de proteínas puede ser un blanco muy adecuado sobre el cual dirigir los estudios de los mecanismos de acción de los aleloquímicos. Se ha demostrado que compuestos aleloquímicos puros como los ácidos benzoico, vainílico, cinámico y ferúlico, inhiben la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -metionina a las proteínas (Baziramakenga et al., 1997). Por otro lado, se conoce que el estrés por calor, frío, hídrico, osmótico, anoxia, hipoxia, patógenos, también alteran el patrón de síntesis de proteínas, induciendo proteínas nuevas, o bien, disminuyendo la expresión de otras.

En el presente trabajo, se describen los cambios observados en el patrón de síntesis de proteínas citoplásmicas de las raíces de frijol, jitomate, calabaza y maíz, al ser expuestas al estrés aleloquímico provocado por los lixiviados acuosos de *Sicyos*, *Lantana*, *Sebastiania* y *Acacia*. Estos cambios fueron analizados por la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE), que al separar polipéptidos individuales nos permite identificar y comparar todas aquellas modificaciones sufridas por las proteínas, por efecto del estrés aleloquímico, y comparar los patrones de cada tratamiento con sus respectivos controles.

El análisis de los resultados mostró que los efectos de los lixiviados acuosos, sobre el crecimiento radicular y la síntesis de proteínas, fueron diversos y específicos, dependiendo de la planta alelopática y de la planta cultivada receptora.

En términos generales, se puede decir que hubo mayor número de casos donde se observó un aumento o disminución en la expresión de ciertas proteínas, y muy pocos casos donde éstas desaparecieron o aparecieron como nuevas. Se puede señalar que las alteraciones en el patrón de proteínas se observaron en proteínas con bajo, mediano y alto peso molecular. Las proteínas que aumentaron o aparecieron con los distintos tratamientos, probablemente están relacionadas con algunos mecanismos de defensa o de adaptación de las plantas al estrés aleloquímico. Las proteínas que aumentaron su absorbancia pueden ser consideradas como 'proteínas de estrés', como las sintetizadas durante un estrés por choque térmico (HSP) (Vierling, 1991; Waters, 1995), las relacionadas con el ataque de patógenos (PR) (Van Loon y Van Strien, 1999) o las sintetizadas durante un estrés hídrico y/o salino (LEA, osmotina, dehidrinas, etc.) (Riccardi, et al., 1998; Bray, 1993). Por otro lado, existe la posibilidad de que el aumento de las proteínas esté relacionado con una alteración en su proceso de síntesis, desde el nivel de traducción, maduración o bien una alteración de la vida media "normal" de la proteína misma (Stryer, 1995).

En el presente trabajo, los aumentos de absorbancia de algunas proteínas por efecto de los lixiviados, superaron, en algunos casos, el 100% con respecto al control, como en los casos del frijol y el maíz con el tratamiento del lixiviado de *Acacia* (Tabla 3, Tabla 9); por el contrario, el grado de disminución observado en las proteínas, fue menor comparado con el grado de aumento, en algunos casos, se alcanzó casi un 60% de disminución, por ejemplo, en el frijol y el jitomate, algunas proteínas disminuyeron más del 50% con el lixiviado de *Lantana* (Tabla 5, Tabla 23). Hurkman y Tanaka, (1988) encontraron que las concentraciones de las proteínas citoplásmicas de la raíz de cebada (*Hordeum vulgare* L.) aumentaron y disminuyeron por el efecto de un estrés salino, osmótico y por deficiencia de agua.

Se puede especular que los aumentos en la expresión de las proteínas observados durante el estrés aleloquímico, son resultado de ajustes bioquímicos y estructurales en las proteínas citoplásmicas que se desencadenan como respuesta de las plantas ante una condición adversa, con el fin de hacerle frente, ajustar su metabolismo y resistir. El aumento de la síntesis de varias proteínas constitutivas, se ha observado en otros tipos de estrés ambientales, por ejemplo, en el estrés hídrico se observa un aumento de las enzimas involucradas en la síntesis de osmolitos (osmoprotectores) (Vernon, et al., 1992); en *Mesembryantum crystallinum*, la isoenzima de la PEPcasa aumenta durante el estrés hídrico y salino (Forsthoefel, et al., 1995; Cushman, et al., 1997, 1999).

En relación con las proteínas que disminuyeron con los diversos tratamientos, se puede sugerir que también se trata de proteínas con una función metabólica determinada. Por ejemplo al analizar las proteínas de las hojas del maíz bajo un estrés hídrico, Riccardi y colaboradores (1998) observaron que algunos de los polipéptidos afectados eran enzimas, como la triosa fosfatoisomerasa, enolasa y la NAD-malato deshidrogenasa, involucradas en la glucólisis y ciclo de Krebs, que son dos rutas metabólicas importantes para la obtención de energía (ATP). En el presente trabajo, se observó que en la calabaza tratada con el lixiviado de *Acacia*, una proteína 18.5 kD, disminuyó. Al secuenciar esta proteína, se lograron identificar once aminoácidos de su terminal amino: LPADVVGYPNXY; esta secuencia mostró similitud con las de proteínas de estrés térmico de la clase II, por ejemplo, con una proteína de 17.4 kD de soya, una de 17.6 kD de *Arabidopsis* y una de 18.8 kD de *Ipomoea ni*, que como puede observarse, poseen un peso molecular similar. Esto indica que probablemente esta proteína de 18.5 kD de la calabaza, pudiera ser una proteína de constitutiva de estrés térmico, cuya síntesis se vio afectada por el lixiviado de *Acacia* (Figura 15, Tabla 15).

Es importante mencionar que en el presente trabajo, sólo se analizaron las proteínas citoplásmicas. Por esta razón, los resultados obtenidos con el lixiviado de *Sicyos* parecen ser contradictorios. Por una parte, este lixiviado causó una fuerte inhibición de las radículas de frijol, maíz y jitomate; sin embargo



en las dos primeras el cambio en su patrón de proteínas no fue muy afectado. Estos resultados sugieren que, probablemente, el mecanismo de acción de los compuestos aleloquímicos de *Sicyos*, inciden sobre otros procesos fisiológicos, o bien que las proteínas modificadas fueran las de membrana, las cuales no se analizaron en este trabajo. En un estudio sobre los efectos del lixiviado de *Sicyos* sobre la ultraestructura de la raíz del frijol y el chilacayote, se observó que la membrana celular se plasmoliza por el efecto de este lixiviado (Cruz-Ortega, et al., 1998), lo que refuerza la hipótesis de que las proteínas afectadas son de membrana. Por otro lado, en todas las raíces de las distintas especies tratadas con el lixiviado de *Sicyos*, se observó un engrosamiento de la punta de la raíz. Este efecto también se ha observado cuando las raíces del trigo son sometidas al estrés por aluminio (Puthota, 1991; Cruz-Ortega y Ownby, 1993). Este engrosamiento puede deberse a una inhibición de la elongación celular, más que a una inhibición de la división celular, aunque esto no ha sido comprobado.

Al contrario de *Sicyos*, los lixiviados acuosos de *Sebastiania*, *Lantana* y *Acacia*, no inhibieron el crecimiento de la raíz del maíz, en cambio fueron capaces de producir un estrés sobre la planta, provocando una alteración en la síntesis de proteínas. Es importante mencionar que el maíz, en relación con el crecimiento de su raíz, es una de las plantas más resistentes a los efectos aleloquímicos de los diferentes lixiviados, y que el jitomate, resultó ser la planta más sensible a estos.

El estudio de los modos de acción de compuestos aleloquímicos, puede ser la base para estudios posteriores sobre el uso potencial de los mismos como plaguicidas, así como para establecer los diversos mecanismos de tolerancia que algunas plantas han desarrollado frente al estrés aleloquímico. Este conocimiento abre una nueva perspectiva de investigación encaminada al mejoramiento genético de ciertas plantas cultivadas.

El presente trabajo resulta ser un pionero en cuanto a la exploración de los efectos de los metabolitos secundarios producidos y liberados al medio por las plantas sobre la expresión de proteínas citoplásmicas en la raíz de otras plantas. Sin duda, se requieren otros estudios, tanto bioquímicos como moleculares, para determinar con más exactitud, cuáles proteínas son las afectadas y que genes las codifican, así como la comparación de su secuencia con las contenidas en diversos bancos de proteínas y genes. De esta manera, podremos determinar la función metabólica de estas proteínas y los procesos en los que están involucradas, así como la importancia particular que tienen en la respuesta de la planta al estrés aleloquímico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., Niu, X., Singh, N. K., Hasegawa, P. M; y Bressan, R. A. 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*. 118(1): 11-23.
- Anaya, A. L., y Pelayo-Benavides, H. R. 1997. Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae): effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy Journal*. 4(1): 57-68.
- Antikainen-M; Griffith-M Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. 1997. *Physiologia Plantarum* 99(3): 423-432
- Alsaadawi, I. S., Aluquili, J. K., Alhadithy, S. M., y Alrubea. 1985. Effect of gamma irradiation on allelopathic potential of *Sorghum bicolor* against weeds and nitrification *J. Chem. Ecol* 11(12): 1737-1746.
- Baziramakenga, R., Leroux, G. D., Simard, R. R., y Nadeau, P. 1997. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. *Can. J. Bot.* 75: 445-450.
- Ben-Hayyim, G., Vaadia, Y., y Williams, B. G. 1989. Protein associated with salt adaptation in citrus and tomato cells: involvement of 26 kDa polypeptides. *Physiol. Plant.* 77: 332.
- Berg, B. 1986. The influence of experimental acidification on nutrient release and decomposition rates of needle and root litter in the forest floor. *For. Ecol. Manage.* 15: 195-213.
- Berg, B., y Agren, G. 1984. Decomposition of needle litter and its organic chemical components: theory and field experiments, long-term decomposition in a scots pine forest. *Can. J. Bot.* 62: 2880-2888.
- Bewley, D., Larsen, K., y Papp J. E. T. 1983. Water-Stress-induced changes in the pattern of protein synthesis in maize seedling mesocotyls: A comparison with the effects of Heat Shock. *J. Exp. Botany* 146(34): 1126-1136.
- Bhargava, A., Srivastava, A. y Kumbhare, V. 1988. Antifungal activity of polyphenolic complex of *Acacia nilotica* bark. *Indian Forester*. 124(5): 292-298.
- Blum, U. y Dalton, B. R. 1985. Effects of ferulic acid and allelopathic compound on leaf expansion of cucumber seedlings grown in nutrient culture. *J. Chem. Ecol.* 11 (3): 279-301.
- Blum, U. y Shafer, R. 1988. Microbial populations and phenolic acids in soil *Soil Biol. Biochem.* 20: 793-800.
- Blum, U. y Rebbeck, J. 1989. Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. *J. Chem. Ecol.* 15: 917-928.
- Blum, U., Gerig, T. M., Worsham, A. D., Holappa, L. D., y King, L. D. 1992. Allelopathic activity in wheat-conventional and wheat-No-Till soils: Development of soil extract bioassays. *J. Chem. Ecol.* 14: 2191-2222.
- Bolwell, G.P., Cramer C. L., Lamb, C. J., Schuch, W. y Dixon, R. A. 1986. L-Phenylalanine ammonia-lyase the *Phaseolus vulgaris* modulation of the levels of active enzyme by trans cinnamic acid. *Planta*, 169: 97-107.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254.
- Bray, E. A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Calera, M. R., Anaya, A. L., y Gavilanes-Ruiz M. 1995a. Effect of phytotoxic asresin glucoside on activity of H<sup>+</sup>-ATPase from Plasma membrana. *J. Chem. Ecol.* 21(3): 289-297.
- Calera, M. R., Mata, R., Anaya, A. L., y Lotina-Hennsen, B. 1995c. 5-O-b-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'4'dihidroxi-4-fenilcumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research.* 00: 1-6.
- Calera, M. R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., y Anaya, A. L. 1996b. Uncoupling Behavior of the 4-phenylcoumarins in Spinach chloroplasts: Structure-Activity Relationships. *J. Agric food Chem.* 44: 2966-2969.
- Chang, W.W.P., Huang, L., Shen, M., Webster, C., Burlingame, A.L., y Roberts, J.K.M. 2000. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol.* 122:295-317.
- Chou, C. H., Lin, T. J., y Kao, C. I. 1977. Phytotoxins produced during decomposition of rice stubbles in paddy soil and their effect on leachable nitrogen *Bot. Bull. Acad. Sin.* 18: 45-60.
- Chou, C. H., y Chiou, S. J. 1979. Autointoxication mechanism of *Oriza sativa*. II effects of culture treatments on the chemical nature of paddy soil and on rice productivity. *J. Chem. Ecol.* 5: 839-859.
- Cooper, P., y Ho, T. D., 1983. Heat Shock proteins in Maize. *Plant Physiol.* 71: 215-222.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L., y Ramos, L. 1988. Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watermelon *J. Chem. Ecol.* 14: 71-86.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L., Gavilanes-Ruiz, M., Sanchez, N. S., y Jimenez, E. N. 1990. Effect of diacetil piquerol on H<sup>+</sup>-ATPase activity of microsomas from *Ipomoea purpurea*. *J. Chem. Ecol.* 16(7): 2253-2261.
- Cruz-Ortega, R., y Ownby, J. D. 1993. A protein similar to PR protein is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol. Plant.* 89: 211-219.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B. E., y Laguna-Hernández, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *J. Chem. Ecol.* 24(12): 2039-2057.
- Cushman J. C. y Bohnert, H. J. 1997. Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. *Plant physiol.* 113: 667-676.
- Cushman J. C., y Bohnert, H. J. 1999. Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. *Annu. Rev. Plant physiol. and Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.
- De Godoy, G. F., Miguel, O. G., y Moreira, E. A. 1991. Antibacterial activity of xanthoxylone constituent of *Sebastiania schottiana*. *Fitoterapia* 62(3): 269-270.

- Del Moral, R., y Muller, C. H. 1970. The allelopathic effects of *Eucalyptus camaldulensis*. *Am. Midl. Nat.* 83: 254-282.
- Devi, S. R., y Prasad M. N. V. 1996. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biol. Plant.* 38(3): 387-395.
- Devi, S. R. y Prasad M. N. V. 1992. effects of ferulic acid on growth and hidrolitic enzyme activities of germinating maize seeds. *J. Chem. Ecol.* 18 (11): 1981-1990.
- Devi, R. S. Pellissier F, y Prasad, M. N. V. 1996. Allelochemicals. Prasad, M. N. V. (Ed). *Plant Ecophysiology*. Jonh Wiley & Sons. Inc. New York. 253-304.
- Einhellig, F. A., Rice, E. L., Risser, P. G., y Wender, S. H. 1970. Effects of scopoletin on growth, CO<sub>2</sub> exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull. Torrey Bot. Club.* 97: 22-33.
- Einhellig, F. A. y Eckrich, P. C. 1984. Interaction of temperature and ferulic acid stress on grain shorgum and soybeans. *J. Chem. Ecol.* 10: 161-170.
- Einhellig, F. A., Stille, M., y Schon, M. K. 1985. Effects of allelochemicals on plant-water relationships. The chemistry of allelopathy. (Ed.) Thompson, A. C. American Chemical Society. Washington, D C. 268: 179-195.
- Einhellig, F. A. 1987. Interactions among allelochemicals and other stress factors of the plant environment. Allelochemicals: Role in agriculture and forestry. (Ed.) Waller, G. R. American Chemical Society. Washington, D C. 330: 343-357.
- Ericson, M. C. y Alfinito, S. H. 1984. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture, *Plant Physiol.* 74: 506.
- Fischer, N. H., Williamson, G. B., Weidenhamer, J. D., y Richardson, D. R. 1994. In search of allelopathy in the florida scrub: The role of terpenoids. *J. Chem. Ecol.*, 20 (6): 1355-1380.
- Forsthoefel, N. R. Cushman, M. A. F., y Cushman, J. C. 1995. Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol* 108: 1185-1195.
- García-Olmedo, F., Salcedo, G., Aragoncillo, C., Sánchez-Monge, R., Collada, C., y Gómez, L. 1988. Two dimensional electrophoresis as a tool for structural an genetic studies of seed proteins from *Poaceae* and *Fagaceae*. *Electrophoresis* 9: 719-727.
- Gershenson, J. 1993. Insect-plant interactions. (Ed.) Bernays, E. A. CRC Press, Boca Raton, F L. 5:105-173.
- Glass, A. D. M. 1976. The allelopathic potential of phenolic acids associated with the rhizosphere of *Pteridium aquilinum*. *Can. J. Bot.*, 54: 2440-2444.
- Granier, F. 1988. Extraction of plant proteins for two dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9: 712-718.
- Hahn, M. y Walbot, V. 1989. Effects of cold treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiol.* 91: 930.
- Harborne, J. B. 1980. In secondary plant products. (Eds.) Bells, E. A. and Charlwood, B. V., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

- Heikkilä, J. J., Papp, J. E. T., Schultz, G. A., y Bewley, J. D. 1984. Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid, and wounding. *Plant Physiol.* 76: 270-274.
- Hernández-Bautista, B. E., Torres-Barragán, A. y Anaya A. L. .1996. Evidences of allelopathy in *Sicyos depeii* (Cucurbitaceae). Resúmenes del First World Congress on Allelopathy. Universidad de Cadiz. International Society of Allelopathy. (IAS) p. 91.
- Hird, D. L., Worall, D., Hodge, R., Smartt, S. W. S., Taul, W. y Scott. 1993. The anthe-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to beta-1,3-glucanases. *Plant J.* 4:1023-1033.
- Holappa, L. D. y Blum, U. 1991. Effects of exogenously applied ferulic acid a potential allelopathic compound on leaf growth water utilization and endogenous abscisic acid levels of tomato cucumber and bean. *J. Chem. Ecol.* 17 (5): 865-886.
- Hoover, J. D., Wender, S. H. y Smith, E. D. 1977. Effect of phenolic compounds on glucose-1-phosphatedehydrogenase isoenzymes. *Phytochemistry.* 16: 199-201.
- Horsley, S. B 1976. Allelopathic interference among plants II. Fisiological modes of action. In H. E. Wilcox y A.T. Hamer (Eds) Proceedings of the 4<sup>TH</sup> North American Forest Biology Workshop, College of Enviromental Science and Forestry, Syracuse, New York. 93-136. Pp
- Hurkman, W. J. 1990. Use of two-dimensional gel electroforesis to characterize changes in gene expression Asociated with salt stress of barley. (Ed.) Katterman F. Academic Press USA. 205-229.
- Hurkman, W. J. Tao, H. P., y Tanaka, C. K. 1991. Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stress. *Plant. Physiol.* 97: 366-374.
- Hurkman, W. J. y Tanaka, C. K. 1988. Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: A comparison using two dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 9: 781-787.
- Hurkman, W. J. y Tanaka, C. K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two dimensional gel electrophoresis. *Plant. Physiol.* 81: 802-806.
- Jabcosen, A., y Corcoran, M. R. 1977. Tannins as Gibberellin antagonists in the synthesis of  $\alpha$ -amylase and acid phosphatase by barley seeds. *Plant. Physiol.* 59: 129-133.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., y Fritig, B. 1987. Biological function of "pathogenesis related" proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *EMBO. J* 6: 3209-3212.
- Kee, S. C., y Nobel, P. S. 1986. Concomitant changes in high temperature tolerance and heat shock proteins in desert succulents. *Plant. Physiol.* 80: 596.
- Key, J. L., Lin, C. Y., y Chen, Y. M. 1981. Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3526.
- Kimpel, J. A., y Key J. L. 1985. Heat shock in plants. *Elsevier Sci.* 376:5067-5071.

- Klein, K., y Blum, U. 1990. Inhibition of cucumber leaf expansion by ferulic acid in split-root experiments. *J. Chem. Ecol.* 16(4): 455-463.
- Koeppel, D. E., Southwick, L. M., y Bittell, J. E. 1976. The relationship of tissue chlorogenic acid concentrations and leaching of phenolics from sunflowers growth under varying phosphate nutrient conditions. *Can. J. Bot.*, 5: 593-599.
- Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology. Ed. Springer. Germany. 321-447.
- Lee, T. T., Stafford, A. N., Jevnikar, J. J., y Stoessi, A. 1980. New phenolic inhibitor of the peroxidase-catalysed oxidation of indoles-3-acetic acid. *Phytochemistry*, 19: 2277-2280.
- Li, H. H., Inoue, M., Nishimura, H., Mizutani, J. y Tsuzuki, E. 1993. Interactions of trans cinnamic acid its related phenolic allelochemicals and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* 19(8): 1775-1787.
- Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press. USA. 1-17.
- Liang, X., Dron, M., Cramer, C., Dixon, R. A. y Lamb C. J. 1989. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J. Biol. Chem.* 264: 14486-14498.
- Linthorst, H. J. M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123-150.
- Macias, F. A., Simonet, A. M., y Esteban M. D. 1994. Potential allelopathic Lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry*. 36: 1369-1379.
- Mandava, N. B. 1985. Chemistry of Biology of allelopathic agents. The chemistry of allelopathy. (Ed.) Thompson, A. C. American Chemical Society, Washington, DC, 268:33-54.
- Mason-Sedum, W., Jessop, R. S., y Lovett, J. V. 1986. Differential phytotoxicity among species and cultivars of the genus Brassica to wheat. *Plant Soil.* 93. 3-16.
- Merlin, G. 1996. Herbicides. Prasad, M. N. V. (Ed). Plant Ecophysiology. Jonh Wiley & Sons. Inc. New York. 253-304 pp.
- Misra, L.N., Dixit, A. K. y Sharma, R. P. .1997. High concentration of hepatoprotective oleanolic acid and its derivatives in *Lantana camara* roots. *Planta Medica.* 63(6): 582.
- Molina, A., Reigosa, M. J., y Carballeira, 1991. Release of allelochemical agents from litter through fall and topsoil in plantations of *Eucalyptus globulus* Labill in Spain. *J. Chem. Ecol.* 17(1): 147-160.
- Molisch, H. 1937. Der einfluss einer pflanze auf die andere allelopathie. Fischer, Jena.
- Moons, A. Valcke, R., y Montage, M. V. 1998. Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C<sub>3</sub> plant. *The Plant Journal.* 15(1): 89-98.
- Moreland, D. F., y Novitzky, W. P. 1987. Effects of phenolic acids, coumarins, and flavonoids on isolated chloroplasts and mitochondria. Allelochemicals, role in agriculture and forestry (Ed.) Waller G. R. American Chemical Society. Washington, D C. 330: 247-261.

- Muller, C. H., y Del Moral, R. 1966. Soil toxicity induced by terpenes from *Salvia leucophylla*. *Bull Torrey Bot. Club*, 93: 130-137.
- Narwal, S. S. 1994. Allelopathy in crop production. Scientific Publishers, Jodhpur, India. 19-161.
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R., y Morris, N. R. 1980. A simplified Ultrasensitive silver stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Bioch.* 105: 361-363.
- O'Farrel, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Ohashi, Y., y Matsuoka, M. 1985. Synthesis of stress proteins in tobacco leaves. *Plant. Cell. Physiol.* 26: 473.
- Ownby, J. D. y Hruschka, W. R. 1991. Quantitative changes in cytoplasmic and microsomal proteins associated with aluminium toxicity in two cultivars of winter wheat. *Plant Cell and Environment* 14: 303-309.
- Puthota, V., Cruz-Ortega, R., Johnson, J., y Ownby, J. (1991). An ultrastructural study of the inhibition of mucilage secretion in the wheat root cap by aluminum. In: wright, R. J., Baligar, V. C., y Murrman, R. P. (eds.). Plant soil interactions at low pH. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 779-787 pp.
- Putnam, A. R. y Tang Ch-Sh. (Eds.). 1986. *The Science of Allelopathy*. Wiley and Sons, New York 317pp.
- Rasmussen, J. A., y Einhellig, F. A. 1979. Inhibitory effects of combinations of three phenolic acids on grain sorghum germination. *Plant. Sci. Lett.* 14: 69-74.
- Resúmenes del First World Congress on Allelopathy. 1996. Universidad de Cadiz Spain. International Society of Allelopathy. (IAS) 278 p.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. Ed Academic press, INC. USA 422 Pp.
- Riccardi, F., Gazeau, P., Vienne de Dominique, y Zivy, M. 1998. Protein Changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* 117(4): 1253-1271.
- Rizvi, H. J. S., y Rizvi V. 1992. Allelopathy: Basic and applied aspects. (Ed.) Chapman & Hall. Londres. 480 pp.
- Sach, M. M., y Ho, T. 1986. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 363-376.
- Sabehat, A., Weiss, D., Lurie, S. 1998. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* 103 (3):437-441
- Singh, N. K., Bracker, C. A., Hasegawa, P. M., Handa, A. K., Buckel, S., Hermodson, M. A., Pfankoch, E., Regnier, F. E. y Bressan, R. A. 1987. Caracterizacion of osmotin, a thumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol.* 85: 529-536.
- Stryer, L. 1995. Bioquímica. Ed. Reverte. España. 1008 pp.
- Stowe, L. G. y Osborne, A. 1980. The influence of nitrogen and phosphorus levels on the phytotoxicity of phenolic compounds. *Can. J. Bot.* 58: 1149-1153.

- Suzuki, K., Itai, R., Nakanishi, H., Nishizawa, N-K., Yoshimura, E., Mori, S. 1988. Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiol.* 116(2): 725-732.
- Tomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 50:571-599
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., y Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant. Mol. Biol. Rep.*12: 245-264.
- Van Loon, L. C. Y Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97
- Van Sumere, C. F., Cottenie, J., De Greef, J. y Kint, J. 1971. Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. *Rec. Adv. Phytochem.* 4: 165-221.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42: 579-620.
- Yu, J. K. y Matsui. 1994. Phytotoxic substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Chem. Ecol.* 20: 21-31.
- Ziegler, H. 1990. Roles of plant physiology assessing productivity potencial under stress environment. *Proceeding of the international Congress of Plant Physiology '88.* New Delhi. India. 10-17.
- Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* 141: 785-795.