



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL ESTRÉS ALELOQUÍMICO SOBRE EL  
METABOLISMO CENTRAL DEL CARBONO DURANTE LA  
GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE *Lycopersicon  
esculentum***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ERNESTO FLORES MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA DEL ROCIO CRUZ ORTEGA



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**  
**VOCAL: DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES**  
**SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**  
**1<sup>er</sup>. SUPLENTE: DR. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ**  
**2<sup>o</sup> SUPLENTE: DRA. NORA ANDREA GUTIERREZ NAJERA**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ALELOPATÍA DEL DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA FUNCIONAL, INSTITUTO DE ECOLOGÍA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**

---

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

---

**DRA. AURORA LARA NUÑEZ**  
**SUPERVISOR TECNICO**

---

**ERNESTO FLORES MARTÍNEZ**  
**SUSTENTANTE**

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado al proyecto *El estrés aleloquímico: su efecto sobre el metabolismo central durante la germinación y establecimiento de semillas*, proyecto PAPIIT IN226607-2; mismo al cual le agradezco la beca proporcionada.

Dra. Rocío Cruz Ortega: Por la oportunidad que me brindo al permitirme formar parte de su grupo de investigación, por enseñarme a ser una mejor persona tanto en el aspecto intelectual como personal y por el apoyo incondicional brindado en todo momento.

Dra. Aurora Lara Núñez: Por las oportunidades únicas que me brindaste, por introducirme en el mundo de la bioquímica, por guiarme en la realización de la presente investigación. Siempre agradeceré la confianza, apoyo y motivación en todo momento desde el día en que te conocí.

A mi familia que siempre me ha apoyado durante toda mi trayectoria académica y en cada proyecto de mi vida por incoherente que sea.

A todos mis compañeros del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, Merle, Verónica, Iris, Iván, Jordi, Claudio, Rosa, Luis, Barbara, Leticia, con los cuales pasé momentos inolvidables y aprendí infinidad de cosas.

A mis Compañeros de la Facultad de Química, Ricardo, Job, Eli, Alejandra Jorge, Jordi, Cristina Emilio, Alberto, Karla Francisco y en especial a Aneli, por todos esos momentos que vivimos, bebimos y convivimos

A mis tres grandes amigos: Guillermo Flores, Esteban Arredondo y Roberto Martínez, señores gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme, estén donde estén, nobles hombres, ahí estaré siempre con ustedes.

## DEDICATORIA

A mis padres Joel y Lucia, que con esfuerzo, perseverancia y amor me han acompañado en la culminación de esta etapa, gracias por ser mi apoyo incondicional y estar siempre dispuestos a escucharme y orientarme cada que lo he necesitado, a ustedes les dedico todos mis logros.

A mi hermano Alejandro cómplice de mil y un travesuras, compañero invaluable, contigo he vivido momentos inolvidables e irrepetibles.

A ti Elida que ahora me acompañas en una nueva etapa, gracias por ser parte de mi vida y compartir conmigo todos esos momento felices a mi lado. Te amo

A todas las personas que estimo, y que me han acompañado durante mi vida. A mi familia, mis amigos, compañeros y maestros. A todos, les doy las gracias por haber estado siempre a mi lado, si la colaboración de todos ustedes este proyecto no hubiera sido tan grato como lo fue.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
Concepto de alelopatía .....	2
Biosíntesis y naturaleza química de los compuestos aleloquímicos .....	2
Vías de liberación de los compuestos aleloquímicos .....	4
Mecanismos de acción de los agentes alelopáticos .....	6
Metabolismo del carbono .....	9
Especies de estudio .....	12
<i>Sicyos deppei</i> G. Don (Curcubitaceae) .....	12
<i>Lycopersicon esculentum</i> L. Mill .....	14
ANTECEDENTES .....	17
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	18
OBJETIVOS PARTICULARES .....	19
METODOLOGÍA .....	19
MATERIAL BIOLÓGICO .....	19
BIOENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	20
EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS .....	20
ENSAYOS ENZIMÁTICOS .....	21
Análisis estadístico .....	26
RESULTADOS .....	27
Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> sobre la movilización de lípidos y proteínas .....	27
Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> sobre el metabolismo central del carbono .....	31
<i>Enzimas de la glucólisis</i> .....	31
Enzimas del ciclo de Krebs .....	34
Enzimas del ciclo del glioxilato .....	35
Enzimas de la gluconeogénesis .....	37
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	39
BIBLIOGRAFÍA .....	43

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formas de liberación de los compuestos aleloquímicos al medio ambiente	6
<b>Figura 2.</b> Fases del proceso de germinación y post-germinación.	9
<b>Figura 3.</b> <i>Sicyos deppei</i> G. Don	12
<b>Figura 4.</b> <i>Lycopersicon esculentum</i> L. Mill (Jitomate)	14
<b>Figura 5</b> Comparación de la cantidad de lípidos totales durante la germinación de semillas de jitomate	27
<b>Figura 6.</b> Cromatografía en capa fina de lípidos totales extraídos de semillas de jitomate	28
<b>Figura 7.</b> Cantidad de acetil-CoA presente en semillas de jitomate control e imbibidas a diferentes tiempos con el lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i>	30
<b>Figura 8.</b> Cantidad de proteína total en semillas de jitomate durante la germinación	31
<b>Figura 9.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima PFK durante la germinación de semillas de jitomate	32
<b>Figura 10.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima PK durante la germinación de semillas de jitomate	33
<b>Figura 11.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima CS durante la germinación de semillas de jitomate	34
<b>Figura 12.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima MDH durante la germinación de semillas de jitomate	35
<b>Figura 13.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima ICL durante la germinación de semillas de jitomate	36

<b>Figura 14.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima MS durante la germinación de semillas de jitomate	37
<b>Figura 15.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima PEPCK durante la germinación de semillas de jitomate	38
<b>Figura 16.</b> Efecto del lixiviado acuoso de <i>S. deppei</i> en la actividad de la enzima FBPasa durante la germinación de semillas de jitomate	39
<b>Figura 17.</b> Ciclo de Krebs	40
<b>Figura 18.</b> Ciclo del Glioxilato	41
<b>Figura 19.</b> Diagrama del Metabolismo del Carbono	42

## **ABREVIATURAS**

<b>ABA</b>	<b>Ácido abscísico</b>
<b>Acetil-CoA</b>	<b>Acetil-coenzima A</b>
<b>ADP</b>	<b>Adenosin difosfato</b>
<b>AIA</b>	<b>Ácido indol acético</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosin trifosfato</b>
<b>BICINE</b>	<b><i>N,N</i>-Bis(2-hidroxi etil) glicina</b>
<b>CS</b>	<b>Citrato sintasa</b>
<b>DTNB</b>	<b>Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)</b>
<b>DTT</b>	<b>Ditiotreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilendiamino tetracético</b>
<b>FBPasa</b>	<b>Fructosa 1-6 bifosfato fosfatasa</b>
<b>HEPES</b>	<b>Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico</b>
<b>ICL</b>	<b>Isocitrato liasa</b>
<b>MDH</b>	<b>Malato deshidrogenasa</b>
<b>MOPS</b>	<b>Ácido 3-(N-morfolino)propano sulfónico</b>
<b>MS</b>	<b>Malato sintasa</b>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleótido reducido</b>
<b>NADP<sup>+</sup></b>	<b>Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado</b>
<b>NADPH</b>	<b>Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido</b>

<b>PEP</b>	<b>Fosfoenolpiruvato</b>
<b>PEPCK</b>	<b>Fosfoenolpiruvato carboxicinas</b>
<b>PFK</b>	<b>6-Fosfofructo cinasa</b>
<b>PK</b>	<b>Piruvato cinasa</b>
<b>PMSF</b>	<b>Fluoruro de fenil-metil-sulfonil</b>
<b>PVP</b>	<b>Polivinilpirrolidona</b>
<b>TRIS</b>	<b>2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol</b>

## RESUMEN

La alelopatía se refiere a las interacciones químicas entre plantas y otros organismos en ecosistemas naturales y agrícolas (Dakshini, et al., 1999). Dichas interacciones son mediadas a través de metabolitos secundarios producidos y liberados al medio por plantas y/o microorganismos *donadores*; estos compuestos pueden influir sobre el metabolismo y desarrollo de otros organismos. Si el efecto de los metabolitos secundarios o *aleloquímicos* es perjudicial, se convierte en un estrés biótico que se conoce como **estrés aleloquímico**, el cual influye directa o indirectamente sobre otras plantas y organismos *receptores* (Anaya, 1999; Reigosa et al., 2002; Romero-Romero et al., 2005; Lara-Núñez et al., 2006; Lara-Núñez et al., 2009). Los alelopáticos o aleloquímicos tienen diversos sitios y mecanismos de acción biológica sobre el organismo receptor: afectan su crecimiento, desarrollo, sobrevivencia, salud, reproducción, respiración, fotosíntesis, actividades enzimáticas, síntesis de proteínas y expresión genética, entre muchos otros procesos (Einhellig, 2002; Weir et al., 2004).

En trabajos anteriores se encontró que la maleza *Sicyos deppei* retrasa la germinación y, por lo tanto, inhibe el crecimiento radicular de *Lycopersicon esculentum* (jitomate) (Romero-Romero, 2002; Romero-Romero, 2005). El objetivo del presente trabajo fue determinar si existe una alteración en el metabolismo central del carbono durante el proceso de la germinación, para lo cual se estudiaron los efectos del estrés aleloquímico producido por un lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre algunas enzimas importantes para el metabolismo del carbono durante la germinación de semillas de jitomate.

Se realizaron bioensayos *in vitro*, imbibiendo a las semillas de jitomate con el lixiviado acuoso de *S. deppei* durante 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. Se determinó la cantidad de lípidos y proteínas totales para cada tiempo y se midieron las actividades de las enzimas más representativas del metabolismo central del carbono: isocitrato liasa (ICL), malato sintasa (MS), citrato sintasa (CS), malato deshidrogenasa (MDH), fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa), fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK), fosfofructo cinasa (PFK) y piruvato cinasa (PK).

En las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* se encontró un retraso generalizado en la movilización de lípidos y proteínas. Este retraso en la movilización se reflejó en el metabolismo central del carbono. Los resultados mostraron una disminución en la actividad de la PFK y un aumento en la actividad de la PK, sugiriendo una alteración en la glucólisis. La actividad de la CS y MDH del ciclo de Krebs, así como las enzimas del ciclo del glioxilato (ICL Y MS) presentaron una disminución en su actividad. Los resultados anteriores sugieren que el metabolismo del carbono es afectado por el estrés aleloquímico producido por *S. deppei*, lo cual conlleva a explicar en parte el retraso en la germinación de las semillas de jitomate.

# INTRODUCCIÓN

## Concepto de alelopatía

Las plantas, en la naturaleza, están expuestas a factores de estrés biótico y abiótico, los cuales pueden afectar su crecimiento y su desarrollo normal. Una de las formas de competencia, o interferencia, entre las plantas es la liberación de compuestos químicos, mismos que pueden causar daño tanto a la progenie de su competidor más cercano como a los de su misma especie. Las interacciones de estos químicos naturales con los organismos dentro de un ecosistema es el área de estudio de la alelopatía. El término alelopatía proviene del griego: *allelon*, recíproco y *pathos*, sufrir (sufrimiento o padecimiento recíproco); y fue utilizado por primera vez por Molisch en 1937 para referirse a los efectos dañinos o benéficos que son directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos que al ser liberados por una planta ejercen su acción sobre otra. Actualmente, se define a la alelopatía como “cualquier proceso que involucre la producción de metabolitos secundarios por plantas y microorganismos que influyen en el crecimiento y desarrollo de otros organismos (excepto animales) en ecosistemas naturales y agroecosistemas” (Anaya, 1999).

En la alelopatía están involucrados diversos componentes, los más importantes son la planta productora de los agentes aleloquímicos, las condiciones ambientales y biológicas del suelo y la planta receptora.

## Biosíntesis y naturaleza química de los compuestos aleloquímicos

La mayoría de los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios derivados de dos rutas metabólicas: una, la del acetato-mevalonato, a partir de la cual se sintetizan terpenos, esteroides, ácidos orgánicos, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos, cetonas, ácidos grasos insaturados simples, ácidos grasos de cadena larga, poliacetilenos, naftoquinonas, antroquinonas, quinonas complejas y, dos, de la ruta del ácido shikímico, de la cual provienen fenoles simples, el ácido

benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhidrinas, algunos de los derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados (Rice, 1984).

La naturaleza química de los agentes alelopáticos es muy variada. A medida que aumenta el número de investigaciones en el tema se incorporan nuevos grupos de sustancias a las cuales no se les atribuía actividad alelopática. La literatura especializada los ordena en los siguientes grupos:

**Compuestos alifáticos:** son compuestos formados por átomos de carbono e hidrogeno, no polares. Comprenden varios ácidos: oxálico, crotonico, fórmico, butírico, acético, láctico y succínico; y alcoholes solubles en agua: metanol, etanol, n-propanol y butanol. Estos compuestos están comúnmente presentes en las plantas y en el suelo. Bajo condiciones aeróbicas los ácidos alifáticos son rápidamente degradados en el suelo, por lo cual no pueden considerarse una importante fuente de actividad alelopática (Bruneton, 2001).

**Lactonas no saturadas:** la psilotina y psilotinina son producidas por *Psilotum nudum*, perteneciente a la familia de las Psilotaceae (Pryer et al., 2001). La protoanemonina es producida por varias ranunculáceas. Son poderosos inhibidores de crecimiento, aunque el rol de estos compuestos en alelopatía no se conoce completamente.

**Terpenoides:** las plantas superiores producen una gran variedad de terpenoides; sin embargo, sólo unos pocos parecen estar involucrados en la alelopatía. Frecuentemente estas sustancias han sido aisladas de las plantas de zonas áridas y semiáridas. Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de los vegetales y los más abundantes y fitotóxicos que han sido identificados en las plantas superiores. Entre los más frecuentes, con actividad alelopática, se pueden citar el alcanfor,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno, 1,8-cineol y el dipenteno (Romagni, 2000). Entre las plantas que se han identificado estos terpenoides están: *Salvia spp*, *Amaranthus*, *Eucalyptus*, *Artemisia*, *Pinus* (Kato-Noguchi,

2009), *Ageratina* y *Eupatorium* (Zhao, 2009). Un sesquiterpeno destacado es el ácido abscísico, una importante hormona vegetal.

**Compuestos aromáticos:** la mayoría de los aleloquímicos identificados son compuestos aromáticos. Incluyen fenoles, derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos (Hyuncheol, 2002; Fiorentino, 2008).

**Alcaloides:** se conocen pocos alcaloides con actividad alelopática. Algunos de ellos: la cocaína, cafeína, cinconina, fisostigmina, quinina, cinconidina, estriquina son reconocidos como inhibidores de la germinación. Por ejemplo, la cebada (*Hordeum vulgare*) exuda, por sus raíces, gramina, la cual inhibe el crecimiento de *Stellaria media*, perteneciente a la familia de las cariofiláceas (Ben-Hammouda y Oueslati, 1999).

### **Vías de liberación de los compuestos aleloquímicos**

Una variedad de agentes alelopáticos son sintetizados y almacenados en células de diferentes tejidos de la planta, ya sea en forma libre o conjugada con otras moléculas, y son liberados al entorno como respuesta a diferentes factores de estrés biótico y abiótico. Se sabe que la ruta de liberación de los compuestos aleloquímicos depende principalmente de su naturaleza química, de si está conjugado con alguna molécula, y de su localización dentro de la célula vegetal (Mandava, 1985). Rice (1984) describe cuatro rutas de liberación de los aleloquímicos al medio: volatilización, lixiviación, exudación radicular y descomposición de residuos vegetales. Por otra parte, la síntesis, la liberación y la toxicidad de los aleloquímicos están influenciadas por una diversidad de factores abióticos como son la luz, la temperatura y la humedad (Einhelling, 1986), y por las características físico-químicas del suelo, como el pH, la aireación y el tipo de suelo (Berg, 1986).

**Volatilización.** La liberación de agentes alelopáticos por volatilización está, frecuentemente, confinada a plantas que producen terpenoides, como el alcanfor,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno y cineol (Fischer et al., 1994). Los géneros que comúnmente liberan compuestos volátiles incluyen *Artemisia*, *Salvia*, *Parthenium*, *Eucalyptus* y *Brassica*. Estas sustancias han demostrado tener también actividad insecticida y ser disuasivos alimenticios. La toxicidad de los compuestos volátiles es muy prolongada cuando sus partículas son adsorbidas por el suelo, pueden permanecer varios meses en él. Un ejemplo, son los monoterpenos liberados por las hojas del eucalipto, los cuales, en la troposfera, tienen una vida media de 17 días. Lo anterior les permite llegar al suelo y permanecer en él (el tiempo va a depender del tipo de suelo) siendo tóxicos para la germinación y crecimiento de otras plantas (Del Moral y Muller, 1970, Romagni, 2000a, Guenther et al., 1995).

**Lixiviación.** La lixiviación es la remoción de sustancias presentes en la planta por efecto de la lluvia, nieve, niebla o rocío. El grado de lixiviación depende del tipo de tejido vegetal, de la edad de la planta, de la cantidad y naturaleza de la precipitación; por ejemplo, de la lluvia ácida. Mediante la lixiviación se liberan una gran variedad de agentes alelopáticos de diferente naturaleza tales como compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides (Rice, 1984).

**Exudados radiculares.** Los compuestos aleloquímicos también pueden ser liberados por las células de la raíz de diversas plantas. Se ha observado que la reducción en la producción algunos cultivos puede ser atribuida a toxinas liberadas por las raíces de malezas o por cultivos adyacentes de plantas (Alsaadawi et al., 1985, Kagan, 2003). Asimismo, existen sustancias, exudadas por las raíces de ciertas plantas, que reducen la germinación de las semillas, el crecimiento de raíces y brotes, la incorporación de nutrientes y la nodulación (Yu y Matsui, 1994). Einhelling (1986) considera que factores tales como la edad de la planta, la nutrición, la luz y la humedad influyen tanto cualitativa como cuantitativamente en la liberación de sustancias por las raíces.

**Descomposición de residuos vegetales.** Los residuos en descomposición liberan una gran cantidad de agentes alelopáticos a la rizosfera (Devi et al., 1996). Los factores que influyen en este proceso incluyen la naturaleza del residuo (hojas, ramas y raíces), el tipo de suelo y las condiciones de descomposición (Mason-Sedum et al., 1986). Eventualmente, las sustancias alelopáticas liberadas por los residuos vegetales entran en contacto con las raíces de plantas presentes en el mismo lugar, ocasionando un efecto fitotóxico. Los compuestos liberados por la planta, frecuentemente, sufren transformaciones realizadas por la microflora del suelo, que pueden originar productos con actividad biológica mayor que sus precursores (Blum y Shafer, 1988).

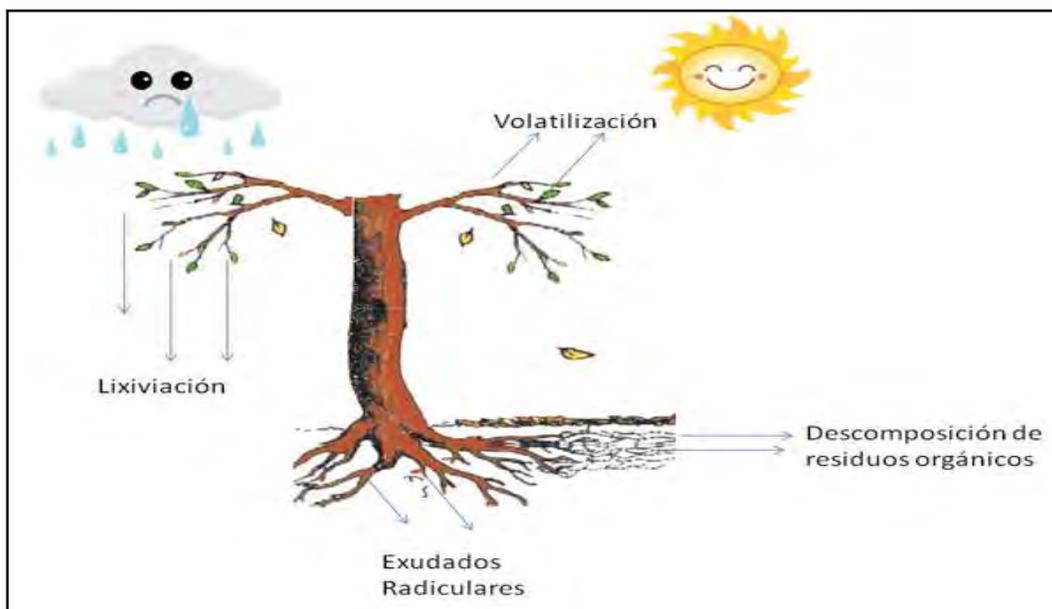


Figura 1. Formas de liberación de los compuestos aleloquímicos al medio ambiente

### **Mecanismos de acción de los agentes alelopáticos**

Diversos estudios han demostrado que el efecto de los aleloquímicos sobre el crecimiento y/o germinación de la planta receptora son sólo la manifestación de los efectos primarios que ocurren a nivel celular (Weir, 2004). Sin embargo, el modo de acción fisiológico, de muchos de ellos, es desconocido debido a la

diversidad de naturalezas químicas de los diferentes agentes alelopáticos y a la variedad de blancos moleculares dentro de la planta receptora (Rizvi y Rizvi, 1992). La mayoría de las investigaciones sobre los mecanismos de acción de los compuestos aleloquímicos se han enfocado en procesos celulares específicos, entre los cuales tenemos:

**Crecimiento y división celular.** Se han reportado diferentes compuestos aleloquímicos que afectan el crecimiento de varias especies de plantas, inhibiendo el crecimiento radicular, retardando la germinación y disminuyendo la expansión foliar (Einhelling, 1995).

**Alteraciones hormonales.** Los compuestos fenólicos pueden reducir o incrementar la concentración del ácido indol acético (AIA). Ciertos monofenoles: por ejemplo, los ácidos p-hidroxibenzoico, vainílico y p-cumárico; reducen la disponibilidad de AIA promoviendo su decarboxilación. Por otra parte, muchos di y polifenoles como los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico, entre otros, sinergizan el crecimiento inducido por AIA suprimiendo la degradación de la hormona. Estos resultados sugirieron que existe un control de los niveles de AIA a través del balance entre mono y polifenoles (Lee et al., 1998).

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal cuyo incremento en la planta normalmente está asociado a una condición de estrés fisiológico. Por ejemplo, un estrés hídrico conduce a un incremento en los niveles de esta sustancia provocando el cierre de estomas (Holappan y Blum, 1991), reduciendo así la transpiración. Por otro lado, Lara et al. (2009) encontraron que el efecto fitotóxico de *S. deppei* está relacionado con niveles altos de ABA que contribuyen en el retraso de la germinación del jitomate.

**Efectos sobre la actividad enzimática** Los compuestos aleloquímicos tienen la capacidad de modificar la síntesis y/o la actividad de enzimas tanto *in vivo* como *in vitro* (Muscolo, 2001). Estos compuestos han demostrado que pueden regular la actividad enzimática de dos maneras: 1) provocando un incremento de la actividad cuando se encuentran en bajas concentraciones y, 2) ocasionando una

disminución a altas concentraciones (Devi et al., 1996a). Por ejemplo, las plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico mostraron un incremento en los niveles de enzimas oxidativas tales como peroxidasa, catalasa y ácido indol acético oxidasa. Al ácido ferúlico también se le atribuye la inhibición de enzimas hidrolíticas tales como amilasa, maltasa, invertasa, proteasa y fosfatasa ácida involucradas en la movilización de reservas (Devi et al., 1996b).

**Efectos sobre la fotosíntesis.** Se han realizado diversos experimentos en plantas, cultivos celulares y cloroplastos para conocer los efectos de los agentes aleloquímicos sobre la fotosíntesis (Einhellig, 1993; Einhellig, 1995; Rimando, 1998). Bioensayos con *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) y *Helianthus annuus* L. (girasol) demostraron que la escopoletina en bajas concentraciones es capaz de inhibir la fotosíntesis (Einhellig et al., 1970). La acción de los compuestos aleloquímicos sobre la fotosíntesis adquiere mucha relevancia debido al potencial herbicida que algunos compuestos aleloquímicos pueden presentar (Devi et al., 1996a).

**Efectos sobre respiración.** Los agentes aleloquímicos, dependiendo de su naturaleza química, de su concentración y de la edad de la planta, pueden alterar o incluso inhibir la respiración. Normalmente para estos estudios se utilizan suspensiones mitocondriales (Keating, 1999; Srivastava, 1998). Las quinonas sorgoleona y juglona son inhibidores efectivos a muy baja concentración. La sorgoleona afecta el transporte de electrones (Gonzalez, 1997; Czarnota, 2001), mientras que la juglona interfiere en el paso de los electrones de la cadena de transporte a la molécula de oxígeno. Cruz-Ortega y colaboradores (1988) observaron que el extracto etanólico del polen de maíz disminuyó el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de sandía por la inhibición del transporte de electrones.

## Metabolismo del carbono

El proceso de la germinación comienza con la absorción del agua (la imbibición) por parte de la semilla seca y termina con la aparición del eje embrionario, generalmente la radícula. En este periodo, fase I y II, la actividad metabólica es intensa debido a que se presentan cambios estructurales subcelulares: Activación de la respiración, síntesis de macromoléculas y, finalmente, la elongación celular (fase III). Las semillas imbibidas reanudan rápidamente su actividad metabólica. Los organelos y las enzimas celulares, esenciales para el comienzo del metabolismo, están presentes dentro de la semilla seca, sobreviviendo a la fase de desecación que termina con la maduración de la semilla. Al iniciarse el proceso de imbibición, una de las primeras funciones que se reanudan es la respiración, que se puede detectar dentro de los primeros minutos del comienzo de la imbibición (Figura 2). La vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs son reactivados durante la fase I de la germinación (Botha et al., 1992). El ciclo de Krebs es capaz de producir cantidades adecuadas de ATP para apoyar el metabolismo durante el proceso de imbibición (Ehrenshaft y Brambl, 1990).

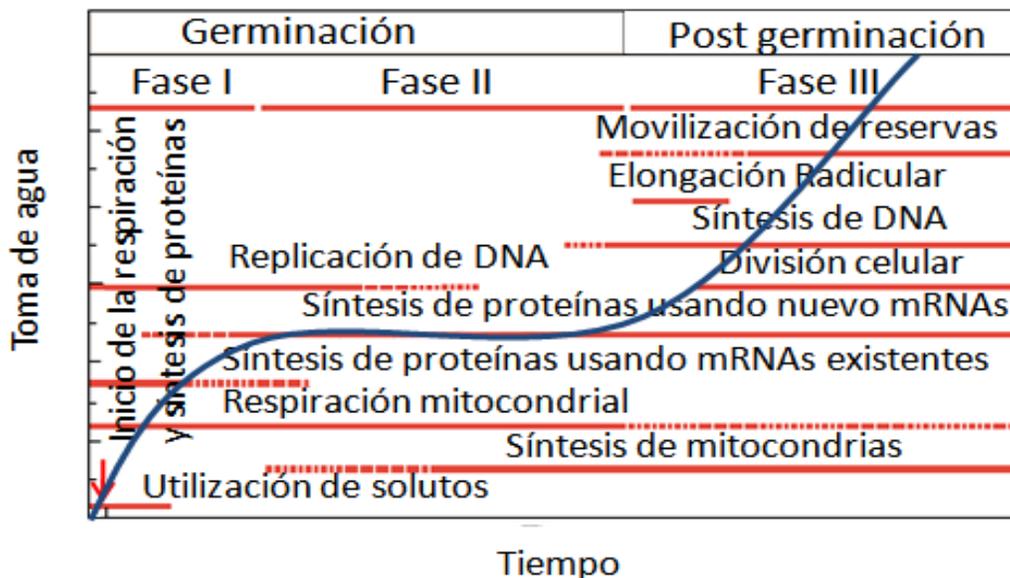


Figura 2. Fases del proceso de germinación y post-germinación. El tiempo requerido para que los procesos se concluyan varía dependiendo de la especie. Adaptada de Bewley (1997).

El metabolismo es una actividad celular altamente coordinada. Consiste en una serie de reacciones químicas interconectadas que comienzan con una molécula en particular y la transforman en otra u otras moléculas según un esquema bien definido.

El metabolismo se divide en dos procesos conjugados: el *catabolismo*, que funciona para la obtención de energía química a partir de la degradación de nutrientes ricos en energía, o de la captura de energía solar; y el *anabolismo* que realiza la conversión de nutrientes en moléculas y la polimerización de precursores monoméricos en macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos). Todas estas transformaciones químicas son realizadas dentro de la misma célula u organismo a través de reacciones específicas, catalizadas por enzimas específicas, que constituyen las vías metabólicas (Lehninger, 2005).

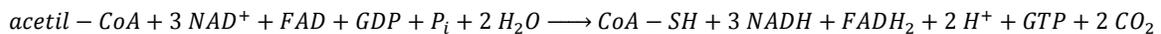
Una de las principales vías metabólicas que se activa al iniciarse la germinación es la glucólisis, la cual es la encargada de oxidar la glucosa y así obtener energía para la célula (Plaxton, 1996; Rolland, 2002). Ésta vía metabólica consiste en 10 reacciones enzimáticas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato. La glucólisis presenta tres puntos de control, los cuales son reacciones de fosforilación y se localizan en la reacción catalizada por la enzima hexoquinasa ( $\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$ ), la reacción catalizada por la enzima fosfofructo cinasa ( $\text{Fructosa-6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fructosa-1,6-bifosfato} + \text{ADP}$ ) y la reacción catalizada por la enzima piruvato cinasa ( $\text{Fosfoenolpiruvato} \rightarrow \text{Piruvato}$ ) (Veramendi, 2002; Roessner-Tunali, 2003). La reacción global de la glucólisis es:



Al final de la glucólisis, las dos moléculas de piruvato continúan oxidándose, por la acción de la piruvato deshidrogenasa, formando dos moléculas de acetil Coenzima A (acetil-CoA) para entrar al ciclo de Krebs.

El ciclo de Krebs, también conocido como ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo del ácido cítrico, es un ciclo metabólico de importancia fundamental en todas las

células que utilizan oxígeno durante el proceso de respiración celular. El ciclo de Krebs es parte de la vía catabólica que realiza la oxidación de hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos hasta producir CO<sub>2</sub>, liberando energía en forma utilizable (poder reductor y GTP). Consta de 8 reacciones enzimáticas. Los sitios primarios de control se encuentran localizados en la reacción catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa (Isocitrato + NAD<sup>+</sup> ↔ α-cetoglutarato + CO<sub>2</sub> + NADH) y en la reacción catalizada por la enzima α-cetoglutarato deshidrogenasa (α-cetoglutarato + NAD<sup>+</sup> + CoA ↔ succinil-CoA + CO<sub>2</sub> + NADH). Existe otro punto de regulación que está presente en algunos organismos y se encuentra en la reacción catalizada por la citrato sintasa (Acetil-CoA + Citrato + H<sub>2</sub>O → Citrato + CoA + H<sup>+</sup>) (Mooney, 2002; Tovar-Mendez, 2003). La reacción global del ciclo de Krebs es:



El ciclo de Krebs tiene una posición central en el metabolismo de los seres vivos y juega un papel clave en las rutas catabólicas. Los intermediarios de éste ciclo están implicados en numerosas rutas metabólicas. A continuación se enumeran de forma resumida las rutas en las que están implicados los metabolitos del ciclo:

- Acetil CoA: β oxidación; biosíntesis de los ácidos grasos; degradación de lisina, valina, leucina e isoleucina; biosíntesis y degradación de la fenilalanina.
- α-cetoglutarato: Biosíntesis de lisina; biosíntesis y degradación del ácido ascórbico y del glutamato.
- Succinil CoA: Biosíntesis y degradación del propanato y de la fenilalanina; degradación de la valina, leucina e isoleucina.
- Succinato: síntesis y degradación del butanato y de la tirosina.
- Fumarato: ciclo de la urea; síntesis y degradación de arginina, prolina y tirosina.
- Oxalacetato: Síntesis y degradación del glioxilato, glutamato y aspartato; gluconeogénesis.

No hay información acerca del efecto del estrés aleloquímico en el metabolismo del carbono durante el proceso de la germinación.

## **Especies de estudio**

### ***Sicyos deppei* G. Don (Cucurbitaceae)**

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Traqueobionta (plantas vasculares)

**Superdivisión:** Spermatophyta (plantas con semillas)

**División:** Magnoliophyta (plantas con flor)

**Clase:** Magnoliopsida (dicotiledóneas)

**Subclase:** Dilleniidae

**Orden:** Violales

**Familia:** Cucurbitaceae

**Género:** *Sicyos*

**Especie:** *Sicyos deppei* G. Don



Figura 3. *Sicyos deppei* G. Don. Maleza endémica de la parte central de México, sumamente invasiva en zonas de cultivo.

*Sicyos deppei* G. Don (*Cucurbitaceae*) es localmente conocida como Ximácol, Tatana o chayotillo; es una planta endémica de la parte central de México (Lira et al., 1998; Lira et al., 2002). Se ha registrado en los estados de Aguascalientes, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de

México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Esta cucurbitácea es una planta trepadora de varios metros de largo, con un tallo ramificado, sin pelos o muy escasos; zarcillos 3 a 4-fidos, con pocos pelos, las hojas tienen pecíolos de 1 a 9 cm de largo, con pelos largos y erectos, limbo ovado, de 2 a 15 cm de largo, lóbulo terminal triangular-oblongo, ápice acuminado, márgenes serrulados, base en forma de corazón, sobre pedúnculos de más de 10 cm de largo, la femenina (solo estigma) dispuesta en glomérulos, sobre pedúnculos de 1 a 2 cm de largo, las flores masculinas con pedicelos de 5 a 12 mm de largo, corola amarillo-verdosa, de 3 a 6 mm de largo y de 3 a 6 mm de diámetro; flores femeninas en número de 5 a 15, el fruto es triangular-ovoide. Semillas dispersadas en frutos de una sola semilla que no se abren, de 6 a 9.5 mm de largo y 4 a 7 mm de ancho, comprimidos, superficie verrucosa, con espinas y pelos, color del fruto verde oscuro, café, café amarillento o negruzco. Las plántulas presentan un hipocótilo cilíndrico, de 15 a 40 mm de largo. Cotiledones de lámina elíptica a elíptico-aovada de 11 a 20 mm de largo y 4 a 14 mm de ancho. Sin epicótilo. Hojas alternas de lámina ampliamente ovada o con tendencia a palmatilobulada, de 5 a 13 mm de largo y 5.5 a 15 mm de ancho, ápice agudo a acuminado, margen irregularmente dentado, base cordada, con pelos.

*S. deppei* es una de las especies más dañinas; crece a orillas de caminos, terrenos cultivados y áreas perturbadas en general, si no se combate a tiempo, puede cubrir un cultivo como cortina debido a que crece rápida y extensamente, este tipo de crecimiento le permite invadir el suelo rápidamente y eliminar otras plantas casi por completo. *S. deppei* es considerada como una maleza perjudicial en los campos de cultivo; afecta principalmente cultivos de algodón, caña, cebada, estropajo, frijón, hortalizas, maíz, mango, nardo, sandía, sorgo, jitomate, disminuyendo su productividad (Villaseñor y Espinosa, 1998).

***Lycopersicon esculentum* L. Mill**

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Traqueobionta (plantas vasculares)

**Superdivisión:** Spermatophyta (plantas con semillas)

**División:** Magnoliophyta (plantas con flor)

**Clase:** Magnoliopsida (dicotiledóneas)

**Subclase:** Asteridae

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Género:** *Lycopersicon*

**Especie:** *Lycopersicon esculentum*



Figura 4. *Lycopersicon esculentum* L. Mill (Jitomate). Planta endémica de Mesoamérica que tiene una gran importancia agrícola en varios países incluyendo México.

*Lycopersicon esculentum* es conocido también como Jitomate, Tomate o Tomatera. La palabra jitomate procede del náhuatl *xictli*, ombligo y *tomātl*, tomate, que significa *tomate de ombligo*. El jitomate ya se cultivaba 700 años a.c. en

México, y en el antiguo Perú antes de la formación del Imperio Inca. Como una curiosidad, debe notarse que, aunque la palabra tomate viene del náhuatl *tomatl*, en el sur de México el tomate es conocido como jitomate; es una planta de la Familia Solanáceas (Solanaceae) originaria del Suroeste de América.

El jitomate es una planta anual, pero a veces puede perdurar más de un año en el terreno; los tallos son ligeramente angulosos, semileñosos, de grosor mediano (cerca de 4 cm en la base) y con tricomas simples y glandulares; las hojas de tamaño medio a grande (10 a 50 cm), alternas, pecioladas, bipinatisectas (con folíolos a su vez divididos) y con numerosos tricomas simples y glandulares; el fruto puede ser redondeado, achatado o con forma de pera. La tomatera produce desde diminutos frutos del tamaño de una cereza, hasta enormes frutos que pueden alcanzar un peso de hasta 750 gr. El fruto del jitomate corresponde a una típica baya, generada a partir de un ovario sincárpico de dos o más carpelos, con una placentación axial, y con numerosos óvulos. Esta baya en madurez presenta un pericarpio carnoso, que encierra dos o más lóculos, y una placenta con una parte carnosa en el eje central y con una parte gelatinosa que llena parcialmente los lóculos, en la cual se ubican las numerosas semillas. La coloración de los frutos maduros varía desde amarillo a rojo y está dada por la degradación de la clorofila y el desarrollo de pigmentos carotenoides (amarillo-anaranjados) y licopeno, pigmento típico de este fruto, de color rojo. El fruto del tomate presenta un alto contenido de agua y, excepto por su contenido de vitamina A y C, no se destaca por ningún otro componente nutricional.

El jitomate es una fuente de antioxidantes (relacionados con la prevención de enfermedades degenerativas y cardiovasculares como cáncer, cataratas y cardiopatías), especialmente de vitamina E y en menor medida de vitamina C, también contiene betacarotenos y flavonoides, como quercitina y licopeno, con potencialidad preventiva, especialmente en cuanto a los problemas de próstata.

**Tabla 1. Composición química del jitomate:**

<b>Agua</b>	<b>94%</b>	<b>Hierro</b>	<b>0.6 mg/100 g</b>
<b>Hidratos de carbono</b>	<b>3% (fibra 1%)</b>	<b>Fósforo</b>	<b>24 mg/100 g</b>
<b>Proteínas</b>	<b>1%</b>	<b>Vitamina C</b>	<b>26 mg/100 g</b>
<b>Lípidos</b>	<b>0.3%</b>	<b>Vitamina A (retinol)</b>	<b>207 mg/100 g</b>
<b>Potasio</b>	<b>258 mg/100 g</b>	<b>Tiamina (Vit. B1)</b>	<b>0.06 mg/100 g</b>
<b>Sodio</b>	<b>3 mg/100 g</b>	<b>Riboflavina (Vit. B2)</b>	<b>0.04 mg/100 g</b>
<b>Calcio</b>	<b>10 mg/100 g</b>	<b>Niacina (Vit. B3)</b>	<b>28 µg/100 g</b>

Fuente: Base de datos de nutrientes (USDA) 2009

El jitomate puede ser atacado por plagas y virus, entre las primeras se encuentra el gusano verde, los pulgones, la mosca blanca y la araña roja; entre los segundos, el virus de la mancha seca del tomate y el virus del Mosaico del tabaco. Así como por nematodos: Heteroderas, Tylenchus, Meloidogynes; bacterias (*Pseudomonas*) o por hongos de diversos géneros: *Pythium*, *Mildiu*, *Antracnosis*, *Cladosporiosis*, *Verticiliosis*, *Fusariosis*; y por la Podredumbre apical, enfermedad producida por déficit de calcio.

## ANTECEDENTES

Como se mencionó, la alelopatía hace referencia a las interacciones químicas entre las plantas y otros organismos, estas interacciones son mediadas por productos químicos (aleloquímicos) los cuales pueden tener un efecto dañino o beneficioso sobre organismos susceptibles (Anaya, 1999; Kobayashi, 2004; Pedrol et al., 2006).

En el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, las investigaciones se han enfocado en los mecanismos de acción o respuestas fisiológicas que están involucradas en el efecto fitotóxico causado por la maleza *S. deppei* (Cucurbitaceae) en el jitomate (*L. esculentum*). Los aleloquímicos liberados por esta maleza causan una inhibición del crecimiento radicular del 70% (Romero-Romero et al. 2006). Esta inhibición ha sido relacionada con varias alteraciones metabólicas como inhibición de la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática y del tonoplasto, daño oxidativo, daño en las membranas (Romero-Romero et al., 2005), y alteraciones en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (Lara-Nuñez et. al., 2006). Asimismo, se determinó la concentración de los principales carbohidratos (almidón, sacarosa, glucosa y fructosa), observándose en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* un retraso en la degradación del almidón del 40% en las primeras 3 horas de imbibición. El contenido de glucosa disminuyó en un 30% aproximadamente, a diferencia de la sacarosa que presentó un incremento en su concentración del 6%, aproximadamente, a lo largo de la germinación. Por otra parte, los niveles de fructosa en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* se mantuvieron a niveles basales hasta las 24 horas; sin embargo, se observó un aumento en la concentración durante las 36 y 48 horas, dicho aumento fue menor que en las semillas control respectivamente. También se analizaron la actividad de algunas enzimas encargadas de la degradación de la pared celular como la endo- $\beta$ -mananasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa [(1,3)-glucan-glucanohidrolasa],  $\beta$ -galactosidasa y la exo-poligalacturonasa, las cuales presentaron una actividad menor en las semillas con el lixiviado; sin embargo, la  $\beta$ - manosidasa presentó una actividad mayor en

las mismas semillas. Estos resultados indican que el lixiviado acuoso de *S. deppei* causa que la actividad de las enzimas hidrolíticas encargadas de debilitar al endospermo se vea disminuida, lo cual puede explicar el retraso en la germinación a través de inhibir la protusión de la radícula (Lara-Nuñez et al., 2009).

Con base en los antecedentes mencionados, el presente estudio tiene como propósito demostrar que existe una alteración en el flujo de energía durante la germinación de semillas de jitomate, debido, parcialmente, al daño en el metabolismo central del carbono inducido por el estrés aleloquímico, provocado por el lixiviado acuoso de *S. deppei*. Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo es la siguiente:

## **HIPÓTESIS**

Si el lixiviado acuoso de *Sicyos deppei* causa estrés aleloquímico produciendo un retraso en la germinación y en la protusión de la radícula, este retraso se deberá, en parte, a la alteración del metabolismo central de carbono afectando la producción de metabolitos intermediarios y de energía necesarios para este proceso.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar si el estrés aleloquímico, provocado por el lixiviado acuoso de *S. deppei*, altera el metabolismo central del carbono durante la germinación de *Lycopersicon esculentum*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Estos objetivos se llevarán a cabo en bioensayos *in-vitro* con semillas de jitomate tratadas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* durante diferentes horas de imbibición (6, 9, 12, 24, 36, 48 hrs):

1. Medir de manera cualitativa si hay movilización de lípidos durante la germinación de semillas de jitomate.
2. Determinar la cantidad total de proteína de las semillas del jitomate durante la germinación.
3. Determinar si el ciclo del glioxilato se ve afectado, midiendo la actividad de la isocitrato liasa (ICL) y la malato sintasa (MS).

4. Analizar si existe una alteración en el ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos), midiendo la actividad de la citrato sintasa (CS) y la malato deshidrogenasa (MDH).
5. Determinar si la gluconeogénesis se ve afectada, midiendo la actividad de la fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa) y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK).
6. Determinar si la Glucólisis se ve afectada, midiendo la actividad de la fosfofructo cinasa (PFK) y la piruvato cinasa (PK).

# METODOLOGÍA

## MATERIAL BIOLÓGICO

La parte aérea de *Sicyos deppei* se colectó en Ciudad Universitaria, D.F. y se secó en una estufa a 27-30°C para su uso posterior.

Las semillas de *Lycopersicon esculentum*, variedad Rio Grande, se obtuvieron de Sun Seeds, Parma, Idaho, USA.

## BIOENSAYOS *IN VITRO*

**PROCESAMIENTO DE LAS SEMILLAS.** Las semillas de *L. esculentum* se lavaron con detergente y se desinfectaron con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos. Posteriormente, se enjuagaron con agua doblemente destilada estéril para eliminar remanentes de hipoclorito y, finalmente, se secaron.

**PREPARACION DEL LIXIVIADO ACUOSO.** El lixiviado alelopático acuoso se obtuvo lixiviando durante 3 horas las hojas y tallos de *S. deppei* (1g/100mL.) en agua destilada estéril. Este lixiviado se filtró a través de un papel filtro Whatman N° 4 y esterilizado por medio de dos filtros Millipore con membrana de 0.45 y 0.22 µm.

**GERMINACION DE SEMILLAS (BIOENSAYOS).** Los bioensayos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar (VECO E2143). Las semillas de *L. esculentum* se germinaron en cajas de petri de 60 mm de diámetro que contenían lixiviado acuoso de *S. deppei* (1% W/V) y agar al 1% (W/V) como sustrato, con una relación 1:1 (V/V) para una concentración final del lixiviado de 0.5% (W/V). Para los controles, las semillas se germinaron en agar al 1% (W/V). Se colocaron veinticinco semillas en cada caja petri y se mantuvieron en obscuridad a 25 °C en una cámara de crecimiento (CONVIRON G30). Las semillas se cosecharon después de 6, 12, 24, 36 y 48 horas de imbibición y se

congelaron con nitrógeno líquido, se molieron con un mortero y se guardaron a -70 °C en un ultra congelador (REVCO).

## EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Para la extracción de lípidos totales se pesaron 300 mg de tejido, se le agregaron 5 mL de una mezcla fría de cloroformo-metanol (1:1 V/V), se homogenizó con un politrón (Tissue Teador 398) y se centrifugó a 5000 g a 4 °C por 15 minutos; se separó el sobrenadante. El precipitado se lavó en 2 ocasiones con 3 mL de la mezcla fría de cloroformo-metanol (1:1 V/V), se homogenizó con un politrón y se centrifugó a 5000 g a 4 °C por 5 minutos. Los sobrenadantes se reunieron en un frasco pequeño limpio, seco y previamente pesado. Posteriormente, el solvente se eliminó totalmente mediante calentamiento a baño María, los frascos pequeños se pesaron y, finalmente, la cantidad de lípidos presentes en cada muestra se calculó por diferencia de peso entre los frascos pequeños limpios y los frascos pequeños con la muestra de lípidos después de eliminar el solvente.

## ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Todos los análisis espectrofotométricos se realizaron en un equipo lector de micro placas (Biotek, ELx808). La determinación de la cantidad de proteína se midió de acuerdo a la técnica de Bradford (1976). Para todas las enzimas se realizó una extracción total de proteínas utilizando 100 mg de tejido y 750 µL de amortiguador de extracción (diferente para cada enzima).

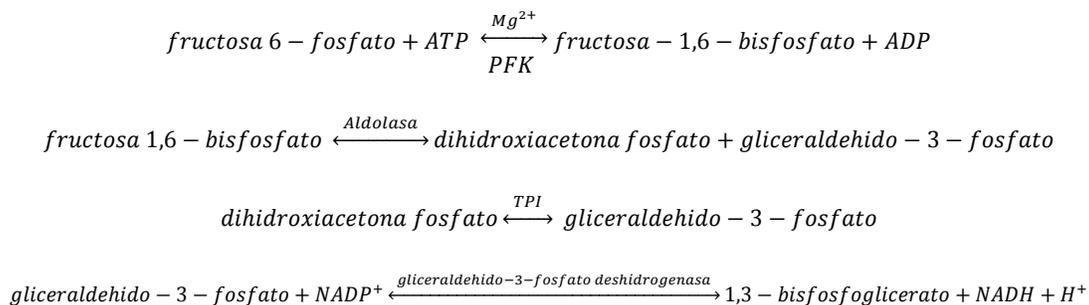
La actividad fue determinada por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \left( \frac{\frac{Abs}{\epsilon} * l}{[proteína]} \right) * 100000000 \frac{\mu mol}{g_{proteina} * minuto}$$

Los ensayos fueron realizados a 25 °C, por ello el valor del coeficiente de extinción molar para cada enzima es el siguiente: ICL es de  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 1.7 * 10^4 \frac{L}{Mol * cm}$ , MS y

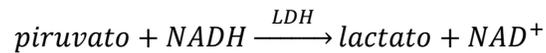
CS  $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 1.36 * 10^4 \frac{L}{\text{Mol} * \text{cm}}$ , MDH, PF, PFK, FBPasa y PEPCK es de  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.22 * 10^3 \frac{L}{\text{Mol} * \text{cm}}$ ,  $l$  es el volumen final de cada ensayo (250  $\mu\text{L}$ ).

**6-Fosfofructo cinasa (PFK) (EC 2.1.7.11).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción utilizado fue: 100 mM TRIS-HCl pH 8.0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 28 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM PMSF y 2% (W/V) PVP, se homogenizó con un politrón (Tissue Teador 398) durante 1 min y se centrifugó a 10,000  $g$  a 4 °C por 10 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el método de Kruger (1988). El ensayo se realizó utilizando 25  $\mu\text{L}$  del extracto total de proteínas más el amortiguador de ensayo [100 mM TRIS-HCl pH 8.0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{NADP}^+$ , 1 mM ATP, 1 UI fructosa-1,6-bisfosfato aldosa, 10 UI triosa fosfato isomerasa, 1.3 UI glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, 5 mM fructosa 6-fosfato], en un volumen total de 250  $\mu\text{L}$ , la reacción se inició al agregar la fructosa 6 fosfato. El análisis se basa en el acoplamiento de la fosforilación de la fructosa 6 a la oxidación del NADH por actividades de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (EC 4.1.2.13), de la triosa-fosfato isomerasa (TPI) (EC 5.3.1.1), y de la de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8), y es supervisada siguiendo la aparición de NADPH a 340 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:

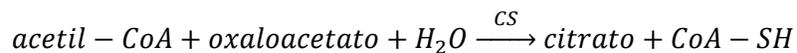


**Piruvato cinasa (PK) (EC 2.7.1.40).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 100 mM TRIS-HCl pH 8.0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 28 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM PMSF y 2 % (W/V) PVP, se homogenizó con un politrón (Tissue Teador 398) y se centrifugó a 10,000  $g$  a 4 °C por 10 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el método de Bucher y Pfeleiderer (1955). El ensayo se realizó con 25  $\mu\text{L}$  del extracto total de proteínas

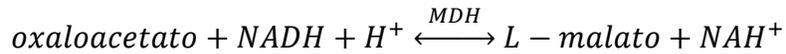
más el amortiguador de ensayo [50 mM MOPS pH 7.0, 100 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 NADH, 1 mM ADP, 0.15 UI lactato deshidrogenasa (LDH), 5 mM fosfoenolpiruvato (PEP)], en un volumen total de 250 µL, la reacción se inició al agregar la PEP y se midió siguiendo a desaparición de NADH a 340 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



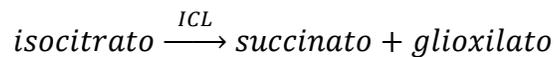
**Citrato sintasa (CS) (EC 4.1.3.7).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 100 mM MOPS pH 8.2, 100 mM BICINE pH 8.2, 3 mM EDTA, se homogenizó con un politrón (Tissue Teador 398), y se centrifugó a 10,000 g a 4 °C por 10 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el método de Srere (1963). El ensayo se realizó con 25 µL del extracto más el amortiguador de ensayo [100 mM MOPS pH 8.2, 100 mM BICINE pH 8.2, 0.2 mM acetil-CoA, 0.1 mM DTNB, 0.2 mM oxalacetato], en un volumen total de 250 µL, la reacción se inició al agregar el oxalacetato y se midió siguiendo la ruptura del DTNB a 412 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



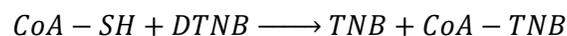
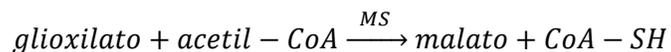
**Malato deshidrogenasa (MDH) (EC 1.1.1.37)** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 100 mM MOPS pH 8.2, 100 mM BICINE pH 8.2, 3 mM EDTA, 5 mM 2β-mercaptoetanol, se homogenizó con un politrón (Tissue Teador 398), y se centrifugó a 20,000 g a 4 °C por 15 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el método de Jeffery et al. (1984). El ensayo se realizó con 5 µL del extracto más el amortiguador de ensayo [100 mM MOPS pH 8.2, 100 mM BICINE pH 8.2, 0.4 mM NADH, 0.2 mM oxaloacetato], en un volumen total de 250 µL, la reacción se inició al agregar la oxaloacetato y se midió siguiendo a desaparición de NADH a 340 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



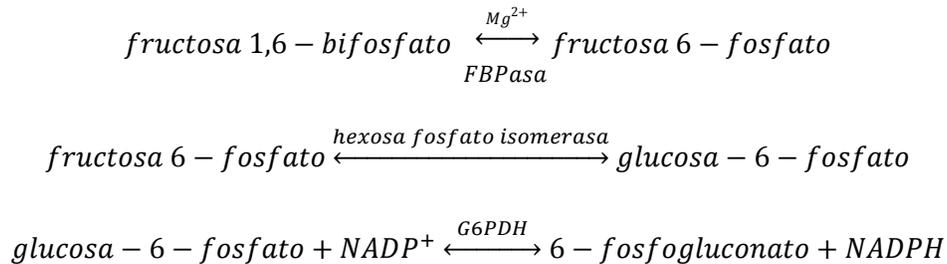
**Isocitrato liasa (ICL) (EC 4.1.3.1).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 100 mM K-fosfatos pH 7.5, 10.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM DTT, se homogenizó con un politrón, y se centrifugó a 15000 g a 4 °C por 15 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el método de Carpenter y Beevers (1959). El ensayo se realizó con 25 µL del extracto más el amortiguador de ensayo [50 mM K-fosfatos pH 6.5, 1 mM DTT, 3 mM fenilhidrazina, 1.75 mM isocitrato] en un volumen total de 250 µL, la reacción se inició al agregar el isocitrato y se midió por la formación del complejo glioxilato-fenilhidrazona a 340 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



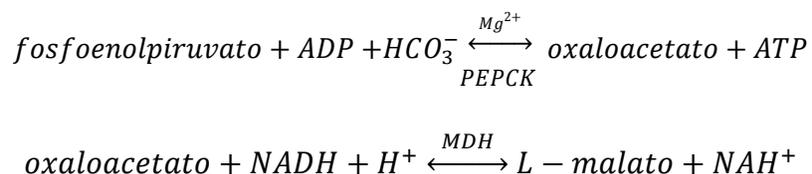
**Malato sintasa (MS) (EC 4.1.3.2).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 100 mM K-fosfatos pH 7.5, 10.2 mM MgCl<sub>2</sub>, se homogenizó con un politrón, y se centrifugó a 15,000 g a 4 °C por 15 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo a la modificación de DTNB (2,4-dinitro-1-tiocianato-benceno) del método de Hock y Beever (1966). El ensayo se realizó con 25 µL del extracto más el amortiguador de ensayo [70 mM TRIS-HCl pH 8, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 DTNB, 0.1 acetil-CoA, 30 mM glioxilato] en un volumen total de 250 µL. La reacción se inició al agregar el glioxilato después de medir la actividad de deacilación endógena sobre la acetil-CoA, la actividad fue medida siguiendo la ruptura del DTNB a 412 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



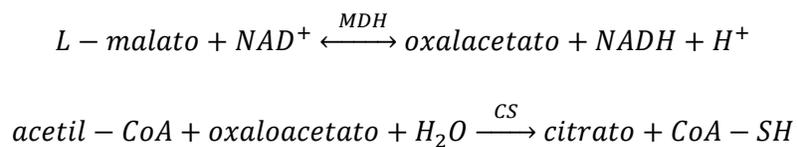
**Fructosa 1-6 bifosfato fosfatasa (FBPasa) (EC 3.1.3.11).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 200 mM TRIS-HCl pH 7.7, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 14 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2% (W/V) PVP, se homogenizó con un politrón, y se centrifugó a 20,000 g a 4 °C por 15 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el método de Kruger y Beevers (1983). El ensayo se realizó con 25 μL del extracto más el amortiguador de ensayo [100 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 54 nM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM NADP<sup>+</sup>, 2 UI hexosa fosfato isomerasa, 1 UI glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 0.5 mM fructosa 1-6 bifosfato], en un volumen total de 250 μL, la reacción se inició al agregar la Fructosa 1-6 bifosfato y se midió siguiendo la aparición de NADPH a 340 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



**Fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) (EC 4.1.1.38).** Para realizar el extracto total de proteínas el amortiguador de extracción fue: 200 mM BICINE-KOH pH 9.8, 5 mM DTT, se homogenizó con un politrón y se centrifugó a 15,000 g a 4 °C por 15 minutos. La actividad enzimática se midió de acuerdo con la técnica de Walker (1995). El ensayo se realizó con 25 μL del extracto más el amortiguador de ensayo [100 mM HEPES pH 7.0, 4%(V/V) β-mercaptoetanol, 100 mM KCl, 90 mM KHCO<sub>3</sub>, 1mM ADP, 10mM MnCl<sub>2</sub>, 0.14 mM NADH, 6 UI malato deshidrogenasa, 5 mM PEP], en un volumen total de 250 μL, la reacción se inició al agregar el PEP y se midió siguiendo a desaparición de NADH a 340 nm durante 15 minutos. La reacción de esta determinación es:



**Acetil-Coenzima A (acetil-CoA):** La determinación de Acetil-CoA se realizó utilizando el método de Karl Decker (1989). Para la extracción de la Acetil-CoA primero se realizó una desproteización, para ello fueron pesados 100 mg de tejido pulverizado, a los cuales se les añadió 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4$  0.5 M, se homogenizó con un vortex (LABNET, VX100), inmediatamente después se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4$  4 M, y se volvió a homogenizar en un vortex, se dejó en reposo durante 5 minutos, posteriormente se adicionaron gotas de  $\text{KOH}$  8.0 M hasta neutralizar y se ajustó el pH a 6.5 con  $\text{KHCO}_3$  1.0 M. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos a 4 °C, se separó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces con 200  $\mu\text{L}$  de agua fría, y en cada lavado se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C, se combinó el sobrenadante con el agua de cada lavado. Para determinar la cantidad de Acetil-CoA se tomaron 80  $\mu\text{L}$  de el sobrenadante y se le añadió el amortiguador de ensayo [200 mM Tris-HCl pH 8.1, 5 mM de DL-malato, 1.5 mM  $\text{NAD}^+$ ] en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , y se midió siguiendo la aparición de NADH a 340 nm durante 15 minutos (a esta lectura se le denominó  $E_0$ ), posteriormente se agregaron 4.5 UI de MDH y se midió siguiendo la aparición de NADH a 340 nm durante 15 minutos (a esta lectura se le denominó  $E_1$ ), finalmente se le agregan 0.375 UI de CS, y se midió siguiendo la aparición de NADH a 340 nm durante 15 minutos (a esta lectura se le denominó  $E_2$ ). La reacción global de esta determinación es:



La cantidad de Acetil-CoA fue calculada de la siguiente forma:

$$1.- E_1 - E_0 = \Delta E_1$$

$$2.- E_2 - E_1 = \Delta E_2$$

$$3.- \frac{\Delta E_2 * 0.2}{\epsilon} \left( 1 + \frac{\Delta E_1}{\Delta E_1 + \Delta E_2} \right) = \mu\text{mol acetil} - \text{CoA}.$$

El valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del NADH es de  $6.22 \text{ [cm}^2\mu\text{mol}^{-1}]$  a 340 nm

### **Análisis estadístico**

Los datos de todos los experimentos realizados de germinación, ensayos enzimáticos, cuantificación de lípidos y proteínas se analizaron a través de una ANOVA de una vía y se utilizó la prueba de Tukey para comprobar las diferencias significativas a  $P < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Originpro 7.5 (2008)

## RESULTADOS

### Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre la movilización de lípidos y proteínas

A través de un estudio gravimétrico se determinó la cantidad de lípidos totales presentes en la semilla durante el proceso de germinación, observándose que la cantidad de lípidos totales era muy similar tanto en las semillas control como en las tratadas con *S. deppei* (Figura 5). La cantidad de lípidos iniciales fue de 0.233 mg y disminuyó aproximadamente en un 40% tanto en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* como en las semillas control. Esta disminución en la cantidad de lípidos se mantuvo a lo largo de la germinación. Al no observarse alguna diferencia significativa en la cantidad de lípidos se procedió a separarlos en fosfolípidos y lípidos neutros mediante una cromatografía en capa fina (Figura 6).

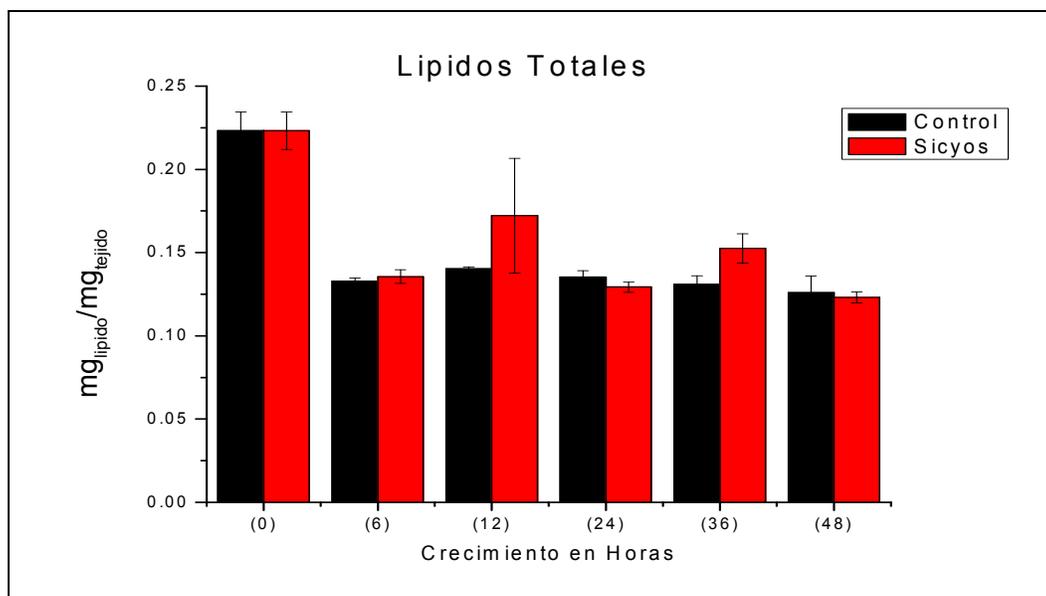


Figura 5. Comparación de la cantidad de lípidos totales durante la germinación de semillas de jitomate (tejido fresco). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes.

La placa está dividida a la mitad de manera vertical, en la parte inferior se observan los fosfolípidos, en los cuales, tanto en el control como en el lixiviado acuoso de *S. deppei*, no hay diferencia; en la parte superior de la placa se encuentran los lípidos neutros, en ellos tampoco se observó un cambio en la cantidad de lípidos por efecto del tratamiento.

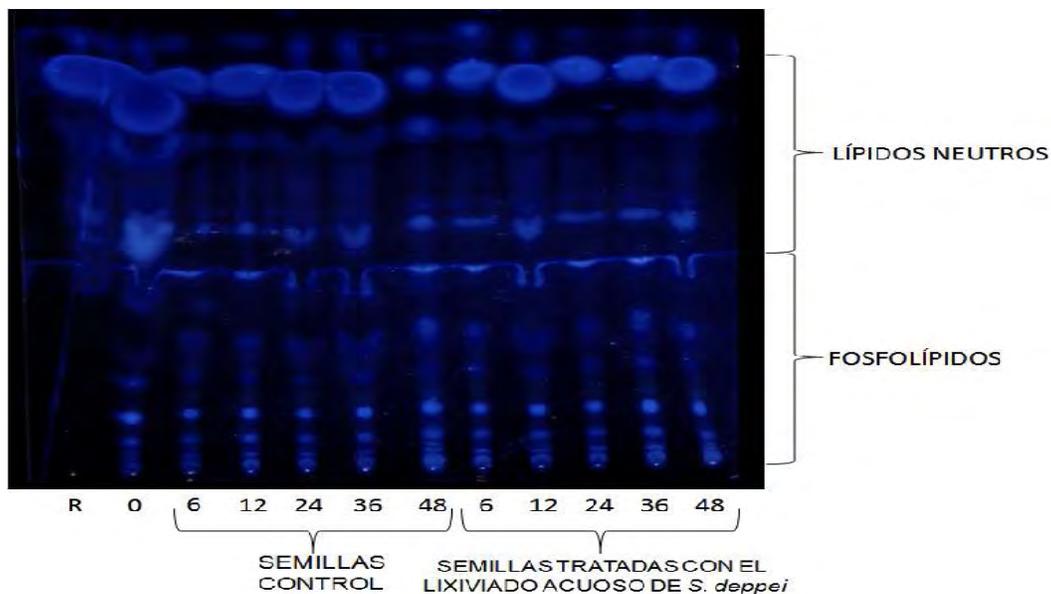


Figura 6. Cromatografía en capa fina de lípidos totales extraídos de semillas de jitomate control y expuestas a 0.5% de lixiviado acuoso de *S. deppei* durante diferentes horas de imbibición. Como referencia (R) se usó aceite de oliva comercial.

Para verificar los resultados anteriores se determinó la cantidad de acetil coenzima A (acetil-CoA) por el método de Karl Decker (1989), debido a que la acetil-CoA es un producto de la degradación de los lípidos, esta última causada por la oxidación.

Al realizar la determinación de la cantidad de acetil-CoA se observó, en las semillas control, un aumento en la cantidad de acetil-CoA después de las 12 hrs.

de germinación, su máxima concentración se alcanzó a las 24 hrs., momento en el cual la radícula empieza a emerger. Al comparar los resultados de las semillas control con las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei*, se observó un retraso en la cantidad de acetil-CoA, en donde la concentración máxima de acetil-CoA se alcanzó hasta las 36 hrs., momento en el cual las semillas imbibidas con *S. deppei* inician la protusión de la radícula. Asimismo, se observó, que doce horas después de alcanzar la concentración máxima de acetil-CoA, tanto en las semillas control como en las imbibidas con *S. deppei* (24 hrs. y 36 hrs. respectivamente), estas tienen una disminución en la concentración de acetil-CoA del 59% aproximadamente (36 hrs. y 48 hrs., respectivamente) (Figura 7). En ambos casos este resultado cambia completamente el panorama que se tenía con los resultados de las técnicas anteriores (gravimetría y cromatografía en capa fina), ya que con estas no se observó un cambio en la cantidad de lípidos. Sin embargo, con la utilización del método de Karl Decker (1989) de la cuantificación de Acetil-CoA, se encontró que posiblemente existe un retraso en la degradación de los lípidos de reserva. Para corroborar este resultado se analizó una enzima de la  $\beta$  oxidación peroxisomal, la Acetil-CoA oxidasa (ACX), debido a que la  $\beta$  oxidación peroxisomal tiene un papel principal en el catabolismo de los lípidos de reserva durante la germinación. La ACX es la enzima con la cual este proceso catabólico inicia, sin embargo, la actividad de esta enzima no se pudo determinar. Una posible causa es que las semillas de jitomate no contienen un alto contenido de lípidos de reserva, por otra parte, Moon et al. (2006), reportan en semillas de arabidopsis, que la expresión del gen que codifica para la ACX es muy baja, y que solo la isoforma ACX2, la cual es las isoformas menos activa, es la que está presente en mayor proporción en las semillas.

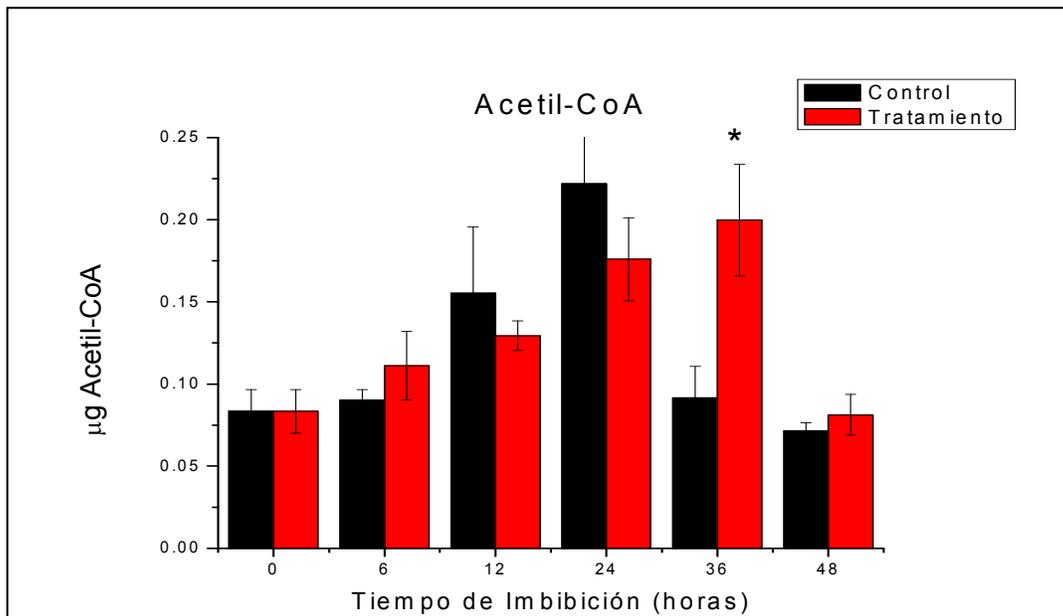


Figura 7. Cantidad de Acetil-CoA presente en semillas de jitomate control e imbibidas a diferentes tiempos con el lixiviado acuoso de *S. deypei*. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Al realizar la cuantificación de proteínas para determinar si existe un retraso en la degradación o en la síntesis de éstas (Figura 8), se observó que la cantidad de proteínas en las semillas control disminuyó un 55 % después de 6 hrs. de imbibición; sin embargo, en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deypei*, la disminución fue únicamente del 15 %, lo que sugiere que hay un retraso en la degradación de las proteínas de reserva. En los tiempos subsiguientes, el comportamiento fue similar en las semillas del control y en el tratamiento. Se observó un aumento en la concentración de proteínas a las 48 hrs. ( $\cong$  67 %), lo que sugiere que a pesar del retraso en la degradación si puede haber síntesis *de novo* en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deypei*. Esta síntesis se da por la demanda de proteínas estructurales para el desarrollo del embrión (Bewley y Marcus, 1990; Testerink et al. 1999; Bradford et al. 2000; Bewley, 2001).

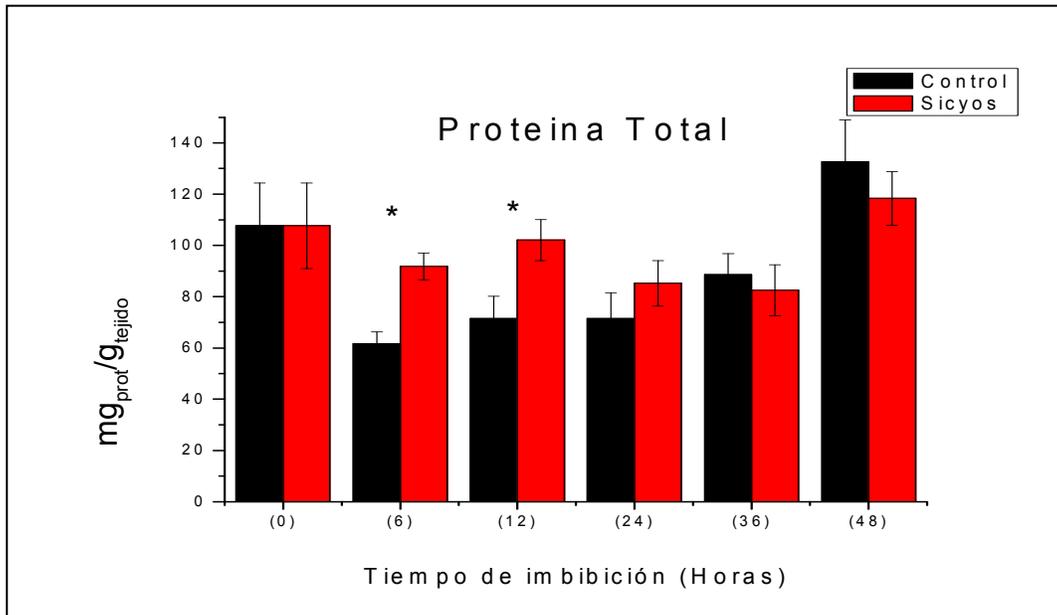


Figura 8. Cantidad de proteína total en semillas de jitomate durante la germinación. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

### Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre el metabolismo central del carbono

Para estudiar el efecto provocado por el lixiviado acuoso de *S. deppei* sobre el metabolismo central del carbono, se analizaron cuatro rutas metabólicas. La primera ruta estudiada fue la glucólisis, ya que con ella inicia el metabolismo central del carbono, a partir de glucosa. Se estudiaron dos enzimas reguladoras, la fosfofructo cinasa (PFK) y la piruvato cinasa (PK).

#### *Enzimas de la glucólisis*

La primera en ser analizada fue la PFK; los resultados obtenidos (Figura 9) mostraron que las semillas tratadas con el lixiviado acuoso de *S. deppei*, en las

primeras 12 hrs., tienen una disminución significativa en la actividad de esta enzima. Esto era de esperarse debido al retraso en la movilización de carbohidratos (Lara-Nuñez et al. 2009). A las 24 y 36 hrs. la actividad en el control disminuye e iguala la actividad de las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei*. La actividad de la enzima, durante el tratamiento, es menor que la actividad presentada por las semillas control.

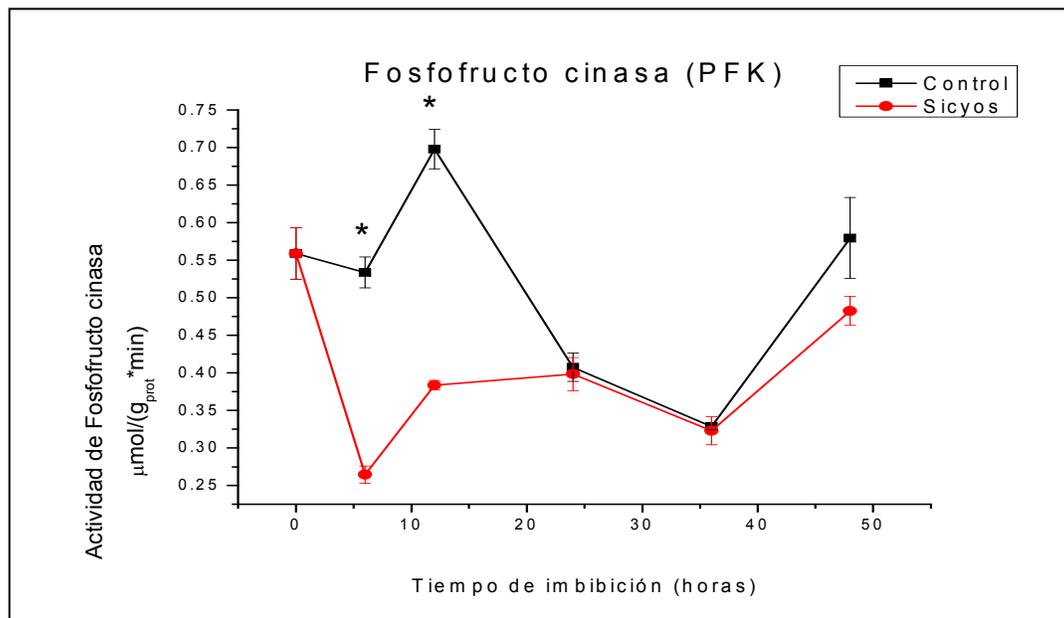


Figura 9. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima fosfofructocinasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La PK presentó un patrón diferente al de la PFK. Podemos observar (Figura 10) que la PK tiene una mayor actividad en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei*, lo que podría deberse, de manera indirecta, al efecto producido por *S. deppei*. Al encontrarse la PFK con una actividad baja (Figura 9), y al existir una disminución en la degradación de lípidos, representada por un retraso en la producción de acetil-CoA (Figura 7), lo cual finalmente induce un déficit de ATP. En estas condiciones, la actividad de la PK se activa; en cambio, en las semillas control no se encuentra retraso alguno en la movilización de

reservas, se presenta una alta concentración de acetyl-CoA y ATP, los cuales son reguladores alostéricos de esta enzima, por tanto, es factible que la enzima de las semillas control se encuentre con una actividad menor que la encontrada en las semillas tratadas con *S. deppei*. Un punto a considerar es que a las 48 hrs. la actividad enzimática de las semillas control presentaron un incremento y las semillas tratadas con *S. deppei* un descenso, esto es debido al cambio en la regulación alosterica de la PK, ya que en las semillas control se necesita una mayor cantidad de energía para el desarrollo de la radícula.

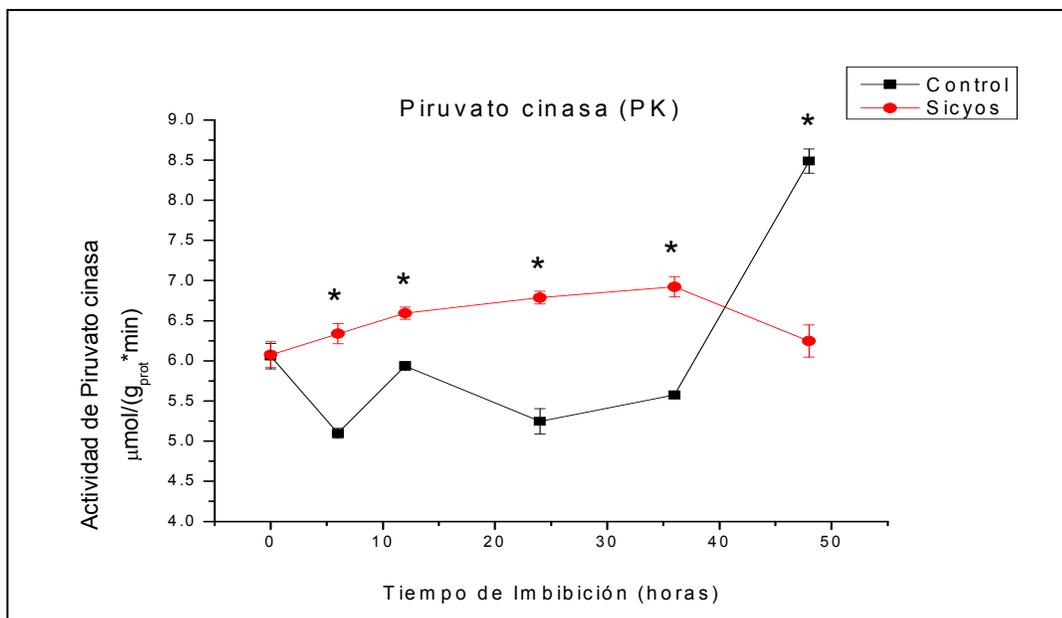


Figura 10. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Piruvato cinasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La glucólisis termina con la producción de piruvato, el cual, por acción de la piruvato deshidrogenasa es transformado en acetyl-CoA. Este intermediario metabólico también proviene de la  $\beta$  oxidación y es esencial para el funcionamiento del Ciclo de Krebs.

## Enzimas del ciclo de Krebs

En este ciclo se estudiaron las enzimas citrato sintasa (CS) y la malato deshidrogenasa (MDH). La CS es la enzima encargada de integrar la acetil-CoA en el ciclo y combinarla con el oxalacetato y transformarlos en citrato. La CS es una enzima reguladora de este ciclo, de aquí la importancia de estudiarla durante el estrés aleloquímico.

En la Figura 11 se observa, en las semillas control, que la actividad de la CS se mantiene estable durante las primeras 6 horas de imbibición; posteriormente a las 12 hrs. tiene un descenso en su actividad y a partir de las 24 hrs comienza a incrementar su actividad por el proceso de germinación. En las semillas tratadas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* la actividad de la CS disminuyó a las 6 hrs. y a las 24 hrs. se observó un aumento, que se mantuvo hasta las 36 y 48 hrs. La actividad de la CS en las semillas tratadas fue significativamente menor que en las semillas control, lo que también puede contribuir al retraso en la germinación provocado por el efecto del lixiviado acuoso del *S. deppei*.

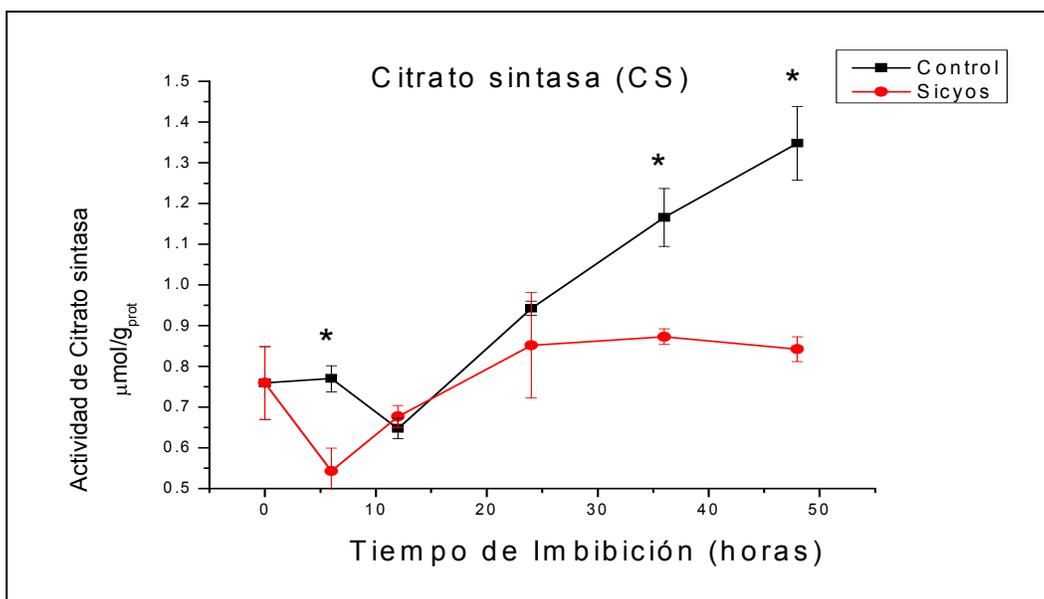


Figura 11. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Citrato Sintasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \* Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La siguiente enzima analizada fue la malato deshidrogenasa (MDH), esta enzima es importante porque pertenece al ciclo de Krebs y al ciclo del glioxilato, además de proveer de precursores, tales como oxaloacetato, fumarato y succinato, entre otros, para la formación de aspartato y otros aminoácidos.

Como se muestra en la Figura 12, la actividad de la MDH en las semillas tratadas fue inhibida significativamente desde las primeras horas de imbibición, y sólo mostró un ligero aumento en su actividad hasta las 48 hrs. Este resultado muestra que el ciclo de Krebs está siendo afectado por la acción del lixiviado de *S. deppei*.

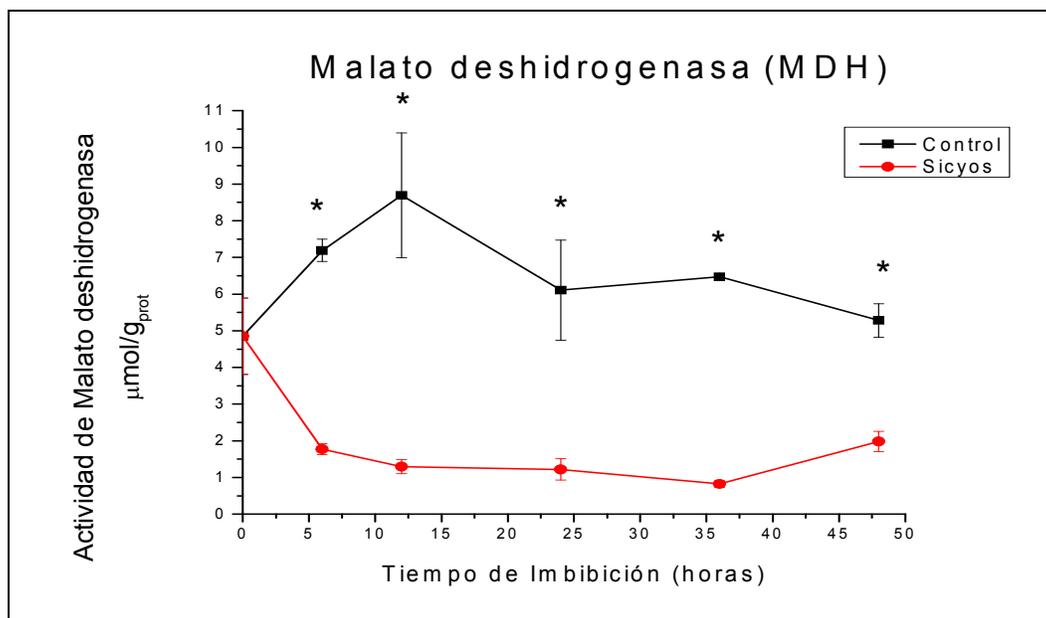


Figura 12. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Malato Deshidrogenasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## Enzimas del ciclo del glioxilato

El ciclo del glioxilato se encuentra presente en plantas y bacterias, quienes lo utilizan para transformar unidades de dos carbonos (acetilos) en unidades de

cuatro carbonos (succinato) para producir energía. Para observar si este ciclo se ve afectado por el estrés aleloquímico, provocado por el lixiviado acuoso de *S. deppei*, se midió la actividad de dos enzimas únicas de este ciclo, la Isocitrato liasa (ICL) y la Malato sintasa (MS).

La actividad de la ICL fue similar hasta las 12 hrs. de imbibición; a partir de este tiempo la actividad de las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei* fue significativamente menor que la actividad de las enzimas en las semillas control. La actividad de la ICL en las semillas control aumentó 4.5 veces con respecto a la de las semillas tratadas. Este aumento coincide con la protusión de la radícula en las semillas control (Figura 13).

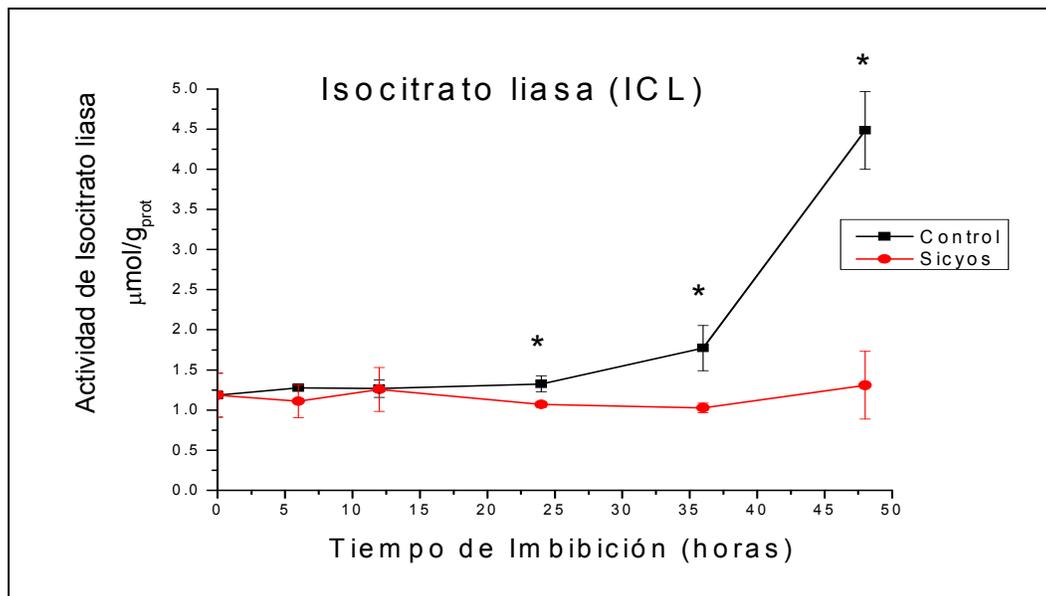


Figura 13. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Isocitrato liasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

La Figura 14 muestra que la actividad de la MS es similar en ambas semillas (control y tratamiento) hasta las 12 hrs. de imbibición; posteriormente, en las

semillas control la actividad de la enzima disminuye drásticamente a las 24 hrs., aumentando su actividad a partir de las 36 hrs., y a las 48 h presenta una diferencia significativa entre la actividad de las semillas control y la actividad de las semillas tratadas con *S. deppei*.

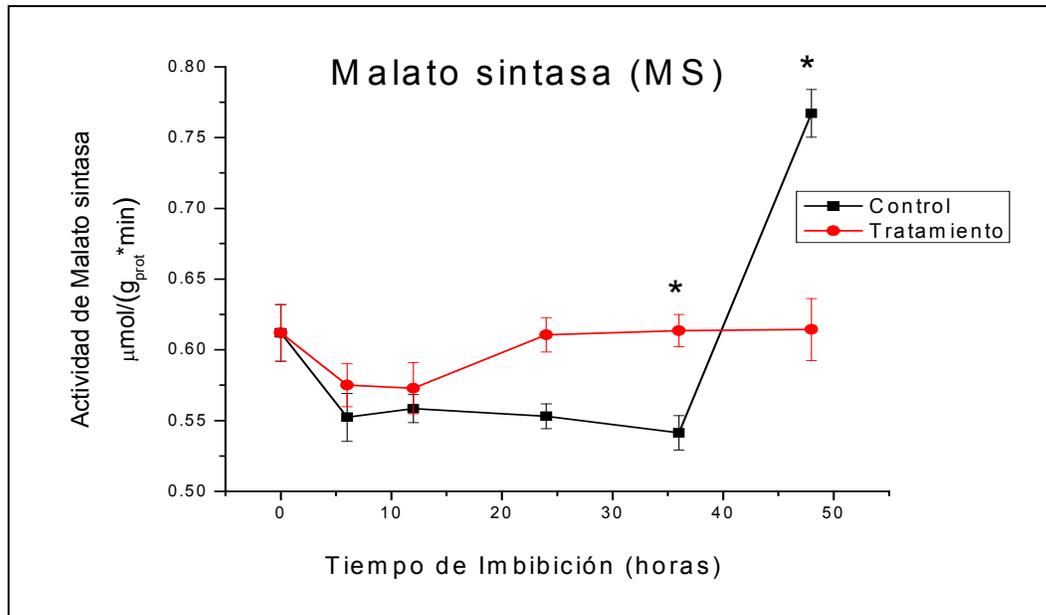


Figura 14. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Malato sintasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ )

## Enzimas de la gluconeogénesis

Para comprobar si la gluconeogénesis presentaba una alteración por la acción del lixiviado acuoso de *S. deppei*, se estudiaron dos enzimas representativas de esta vía: la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la fructosa 1,6-bifosfato fosfatasa (FBPasa).

Con respecto a la actividad de la PEPCK no se encontró diferencia estadística entre la actividad de las semillas tratadas con *S. deppei* y las semillas control, lo cual nos puede sugerir que esta vía no está siendo afectada por los aleloquímicos de *S. deppei* (Figura 15).

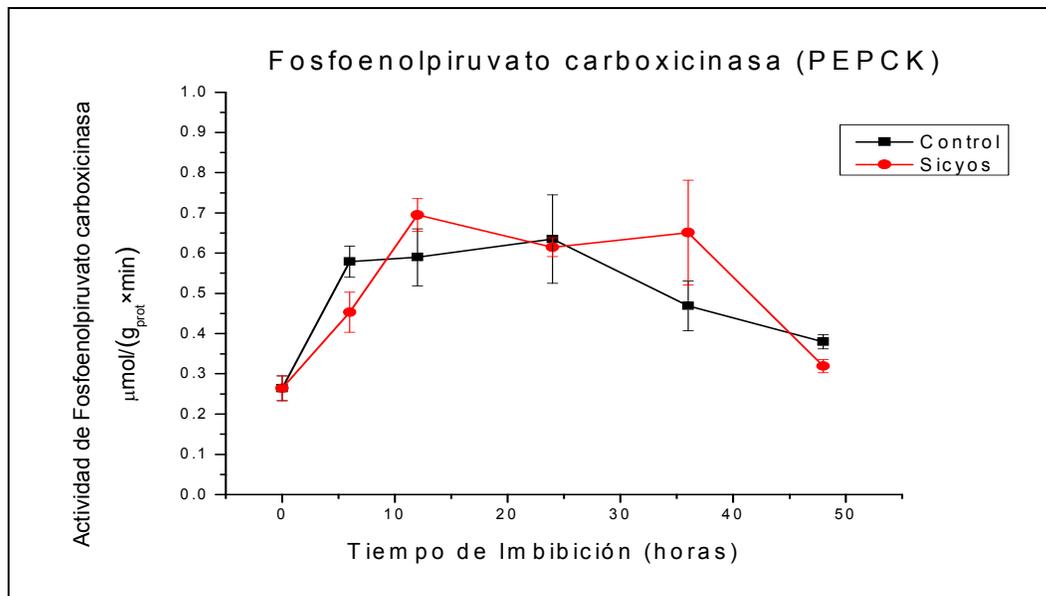


Figura 15. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Fosfoenolpiruvato carboxicinasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes.

La actividad de la FBPasa es similar en las semillas de ambos tratamientos hasta las 24 hrs. de imbibición. A partir de este tiempo, la actividad de las semillas imbibidas con *S. deppei* es significativamente menor que en las semillas control (Figura 16).

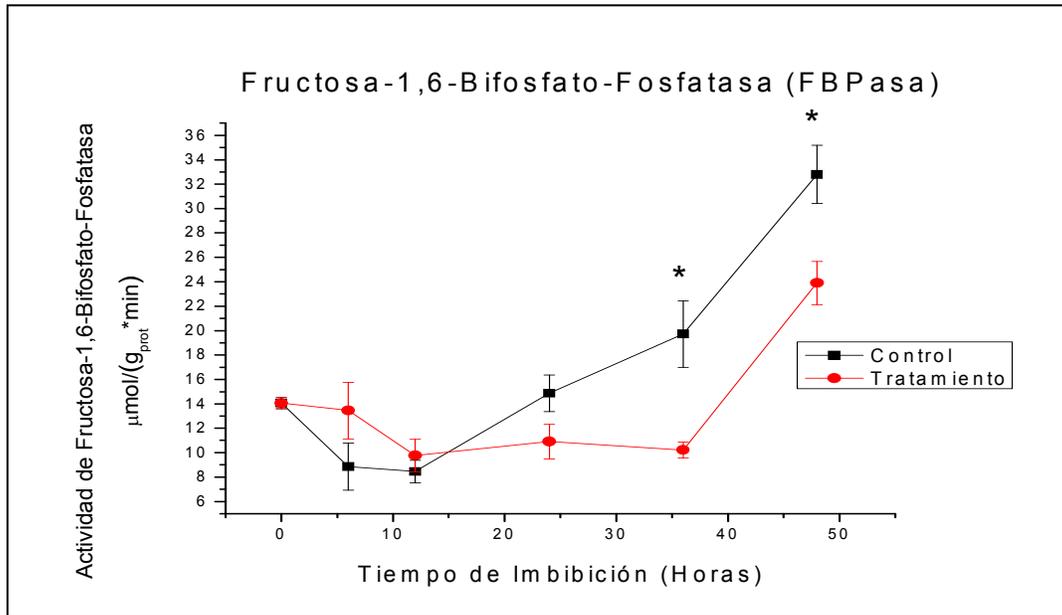


Figura 16. Efecto del lixiviado acuoso de *S. deppei* en la actividad de la enzima Fructosa 1,6-bifosfatasa durante la germinación de semillas de jitomate. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 repeticiones y la representación de por lo menos 3 experimentos independientes. \*Diferencia estadística usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los mecanismos de acción de los compuestos aleloquímicos han sido estudiados, por separado, a través de los efectos producidos en diferentes procesos fisiológicos; por ejemplo, en la división celular, la respiración, la fotosíntesis o el crecimiento, por mencionar algunos. Sin embargo, el efecto del estrés aleloquímico sobre el metabolismo central es un mecanismo que no ha sido abordado y, en particular, durante el proceso de germinación.

En el presente trabajo se muestran los efectos producidos por el estrés aleloquímico, inducido por la maleza *S. deppei* sobre la germinación de *L. esculentum*, haciendo énfasis en el metabolismo central del carbono y cómo éste se ve afectado durante el proceso de imbibición. Los resultados muestran que, en general, durante la imbibición hay una alteración en la movilización de lípidos y proteínas (Figuras 7 y 8) en las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei*, lo que sugiere que estas semillas pueden tener un menor suministro de metabolitos como son unidades de acetil CoA y precursores para la síntesis de

novo de las proteínas (aminoácidos) que provienen de vías metabólicas como el ciclo de Krebs (Figura 17).

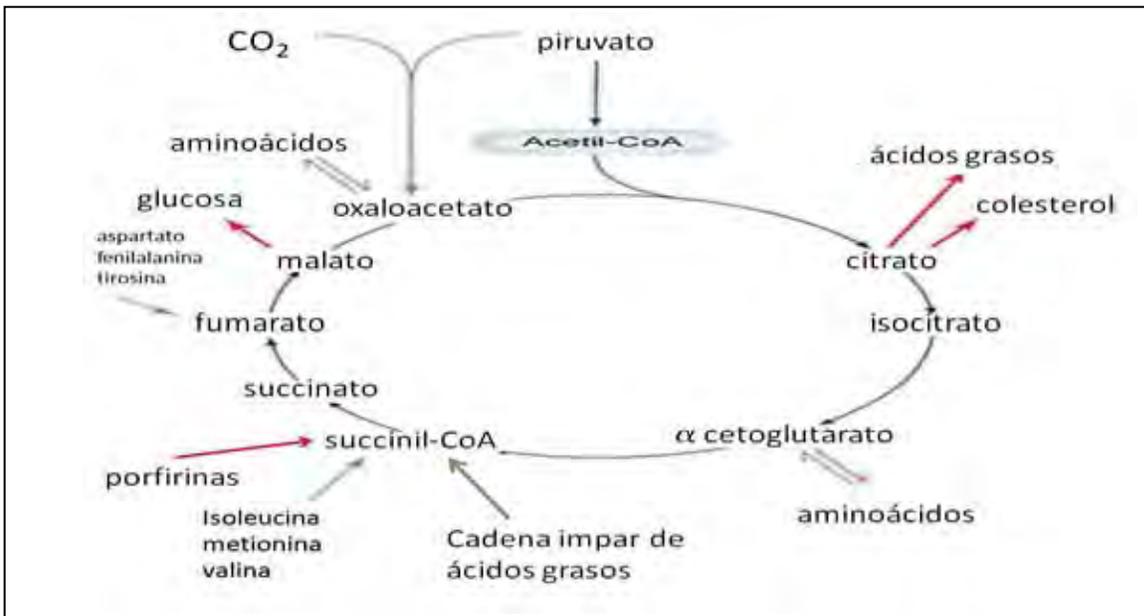


Figura 17. Ciclo de krebs Adaptada de <http://www.biol.unlp.edu.ar/>

Al existir un déficit en la movilización de las reservas energéticas, el metabolismo del carbono también se ve afectado. Lara-Nuñez y colaboradores (2009) reportaron un retraso en la degradación del almidón durante la imbibición con el lixiviado de *S. deppei*. Este retraso se puede relacionar con la disminución en la actividad de la PFK; en las primeras 12 hrs. de imbibición la actividad de ésta enzima, en las semillas imbibidas, presentó una disminución significativa (Figura 9). Al analizar las enzimas del ciclo del glioxilato y ciclo de Krebs se observó que el metabolismo del carbono seguía presentando una alteración en las semillas tratadas. La MS, una de las dos enzimas únicas del ciclo del glioxilato, presentó (Figura 14), en las semillas control, una actividad menor en comparación con la actividad de las semillas imbibidas con el lixiviado acuoso de *S. deppei*, a partir de las 24 hrs., momento en el cual las semillas control inician la protusión radicular. La disminución en la actividad de la MS de las semillas control se puede atribuir a un déficit en la cantidad de glioxilato producido por la ICL, una de las dos enzimas únicas del ciclo del glioxilato. La actividad de esta enzima, en las semillas control, aumentó significativamente (Figura 13), esto sugiere que la ICL puede estar



En resumen, las alteraciones en el metabolismo del carbono y sus implicaciones en la germinación de las semillas de jitomate se muestran en la Figura 19 de donde podemos concluir:

- ⊙ Se observan alteraciones en la movilización de lípidos y proteínas
- ⊙ La glucólisis, a través de la actividad de la PFK y PK, presenta alteraciones en las primeras horas de imbibición.
- ⊙ La actividad de MS, ICL, CS y la MDH de los ciclos de Krebs y glioxilato son modificadas por el tratamiento
- ⊙ Por lo tanto, el aporte de metabolitos y de precursores, así como la producción de energía, no es suficiente para que el proceso de la germinación se lleve de manera normal, lo que refleja el retraso de la protusión de la radícula.

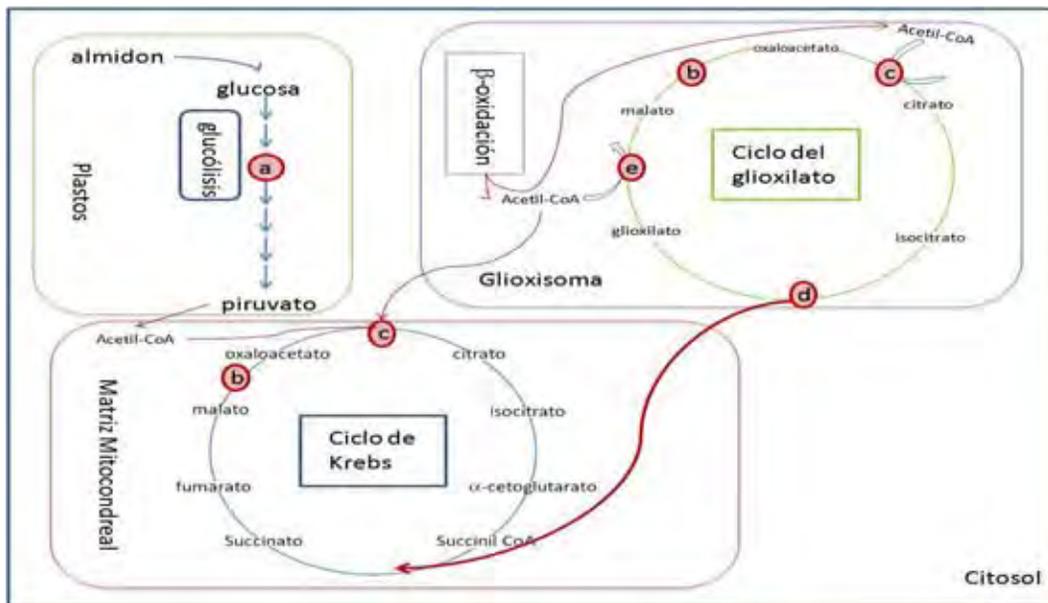


Figura 19. Diagrama del Metabolismo del Carbono donde se muestran los ciclos estudiados y las enzimas cuya actividad es modificada durante la germinación de las semillas de *Lycopersicon esculentum*, en presencia del lixiviado acuoso de la maleza *Sicyos deppei* (estrés aleloquímico). Las letras en círculos rojos representan las enzimas involucradas y corresponden: a: PFK; b: MDH; c: CS; d: ICL e: MS. Las flechas en negro representan disminución (hacia abajo) y aumento en la actividad (hacia arriba).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alsaadawi IS, Al-Uqaili JK, Alrubeaa AJ, Al-Hadithy SM (1986). Allelopathic suppression of weeds and nitrification with selected cultivars of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Chemical Ecology* 12:209–220
2. Anaya AL (1999). Allelopathy as a tool in the management of biotic resources en agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18 (6):697-739
3. Berg B (1986). The influence of experimental acidification on nutrient release and decomposition rates of needles and root litter in the floor. *Forest Ecology and Management* 15:195-213
4. Ben-Hammouda M, Oueslati O. (1999). A germination bioassay to test the allelopathic potential of barley. *Rachis Newsletter* 18:51-5
5. Bewley JD, Marcus M (1990). Gene expression in seed development and germination. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology* 38:165–193.
6. Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant cell* 9:1055–1066
7. Bewley DJ (2001). Seed germination and reserve mobilization. *Encyclopedia of Live Sciences*, John Wiley and Sons, Ltd.
8. Botha FC, Potgeiter GP, Botha AM (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Journal of Plant Growth Regulation* 11:211–224.
9. Bradford MR (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
10. Bradford KJ, et al. (2000) Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: Black M, Bradford KJ and Vasquez-Ramos J (eds) *Advances and Applications in Seed Biology*. Proceedings of the 6th International Workshop on Seeds 231–251
11. Bruneton J (2001) *Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales* 2<sup>da</sup> ed Editorial Acriba. Madrid España 550-553

12. Bucher T, Pfliederer G (1955). Pyruvate kinase from muscle. *Methods in Enzymology* 1:435-440
13. Blum U, Shafer SR (1988). Microbial population and fenolic acid in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20:793-800
14. Burrell MM, Mooney PJ, Blundy M, Carter D, Wilson F, Green J, Blundy KS, Rees T (1994). Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta* 194:95-101
15. Cooper TG, Beevers H (1969). Mitochondria and Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. *Journal of Biological Chemistry* 244:3507–3513
16. Cruz-Ortega R, Anaya AL, Ramos L (1988). Effects of allelopathic compounds of corn pollen on respiration and cell division of watermelon. *Journal of Chemical Ecology* 14 (1):71-86.
17. Cruz-Ortega R, Anaya AL, Gavilanes-Ruiz M, Sánchez-Nieto S, Jiménez-Estrada M (1990). Effect of diacetyl piquerol on the H<sup>+</sup>ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*. *Journal of Chemical Ecology* 16(7):2253-2261.
18. Cruz-Ortega R, Anaya AL, Hernández BE, Laguna G (1998). Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology* 24(12):2039-2057.
19. Cruz-Ortega R, Ayala-Cordero G, Anaya AL (2002). Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum* 116:20-27.
20. Czarnota MA, Paul RN, Dayan FE, Nimbai CI, Weston LA (2001). Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum spp.* root exudates. *Weed Technology* 15:813–825
21. Dakshini KMM, Foy CL, Inderjit (1999). Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. *Principles and Practices in Plant Ecology:*

Allelochemical interactions. Edited by Inderjit, K.M.M. Dakshini and Chester L. Foy. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 3-14

22. Deker k. (1989). Acetil-CoA uv-spectrophotometric assay. *Methods in Enzymology* 1989-1993
23. Del Moral R, Muller, CH (1970). The allelopathic effects of *Eucalyptus camaldulensis*. *American Midland Naturalist* 83:254–282.
24. Devi SR, Pellissier F, Prasad MNV (1996a). Allelochemicals. *Plant Ecophysiology*. Ed., John Wiley and Sons, New York 253–303.
25. Devi SR, Prasad MNV (1996b). Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Plant Biology* 38:387-395
26. Ehrenshaft M, Brambl R (1990). Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology* 93:295–304
27. Einhellig FA, Rice EL, Risser PG, Wender SH (1970). Effects of scopoletin on growth, CO<sub>2</sub> exchange rates, and concentration of scopoletin, scopolin, and chlorogenic acid in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull Torrey Bot Club* 97:22–23
28. Einhellig FA. (1985). Allelopathy A natural protection, allelochemicals. *Handbook of Natural Pesticides Methods* 1:161-200.
29. Einhellig, FA (1986). Mechanisms and modes of action of allelochemicals. *The Science of Allelopathy* Putnam, A. R. and Tang, Ch-Sh., Eds., John Wiley and Sons, New York 184
30. Einhellig FA, Rasmussen JA, Hejl AH, Souza IF (1993a). Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. *Journal of Chemical Ecology* 19:369–375
31. Einhellig FA, Hejl AM, Rasmussen JA (1993b). Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration. *Journal of Chemical Ecology* 19:559–568
32. Einhellig FA (1995) Allelopathy: current status and future goals. In: Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA (eds) *Allelopathy: organisms, processes and applications*. American Chemical Society, Washington DC 1–24

33. Einhellig FA. (1996). Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal* 88:886-893
34. Einhellig FA. (1999). An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. En: *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemical Interactions*. Inderjit, Dakshini KMM y Foy CL. (eds.). CRC Press, New York.
35. Einhellig FA. (2002). The physiology of allelochemical action: clues and views. En *Allelopathy from molecules to ecosystems*. Reigosa M, Pedrol N (eds). Science Publishers, Inc. USA: 1-23
36. Fiorentino A, D'Abrosca B, Pacifico S, Izzo A, Letizia M, Esposito A, Monaco P (2008). Potential allelopathic effects of stilbenoids and flavonoids from leaves of *Carex distachya* Desf. *Biochemical Systematics and Ecology* 36:691–698
37. Fischer NH, Williamson GB, Weidenhamer JD, Richardson DR (1994). In search of allelopathy in the Florida scrub: the role of terpenoids. *Journal of Chemical Ecology* 20:1355–1380.
38. Gonzalez VM, Kazimir J, Nimbali C, Weston LA, Cheniae GM (1997). Inhibition of a photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45:1415–1421
39. Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, Fall R, Geron C, Graedel T, Harley P, Klinger L, Lerdau M, McKay WA, Pierce T, Scholes B, Steinbrecher R, Tallamraju R, Taylor J, Zimmerman P (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research* 100:8873–8892
40. Hock B, Beevers H (1966). Development and decline of glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad) effects of dactinomycin and cycloheximid. *Z Pflanzenphysiol* 55:405-414
41. Holappa LD, 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. *Journal of Chemical Ecology* 17:865-886

42. Hyuncheol Oha, Sunyoung Leea, Ho-Sub Leea, Dong-Heon Leeb, Seung Yeob Leeb, Hun-Taeg Chungc, Tae Soo Kimd, Tae-Oh Kwon (2002). Germination inhibitory constituents from *Erigeron annuus*. *Phytochemistry* 61:175–179
43. Jeffery D, Smith C, Goodenough, Prosser I, Grierson D (1984). Ethylene-independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes. *Plant Physiology* 74:32-38
44. Kagan IA, Rimando AM, Dayan FE (2003). Chromatographic separation and in vitro activity of sorgoleone congeners from the roots of *Sorghum bicolor*. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 51:7589-7595
45. Kato-Noguchia H, Fushimia Y, Shigemori H. (2009). An allelopathic substance in red pine needles (*Pinus densiflora*). *Plant Physiology* 166:442—446
46. Keating KI. (1999). Allelochemicals in plankton communities. In *Principles and Practice in Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. Edited by Inderjit, Chester LF, Dakshini KMM. Boca Raton: CRC Press 165-178.
47. Kobayashi K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biology and Management* 4:1–7
48. Kruger NJ, Kombrink E, Beevers H. (1983). Pyrophosphatefructose 6-phosphate phosphotransferase in germinating castor bean seedlings. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 153:409-412
49. Kruger NJ, Beevers H. (1984). Effect of fructose 2,6-biphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose 1,6-biphosphatase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiology* 76:49-54.
50. Kruger NJ, Hammond JBW, Burrell MM (1988). Molecular characterization of four forms of phosphofructokinase purified from potato tuber. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 267:690-700
51. Lara-Núñez A, Romero-Romero T, Ventura JL, Blancas V, Anaya AL, Cruz-Ortega R (2006). Allelochemical stress causes inhibition of growth and

- oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant Cell and Environment 29:2009-2016
52. Lara-Núñez A, Sanchez-Nieto S, Anaya AL, Cruz-Ortega R. (2009). Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. Physiologia Plantarum 135:0-0.
53. Lee DJ, Kim SS (1998). The regulation of 5' upstream regions of a Korean radish cationic peroxidase gene by gibberellic acid and abscisic acid. Plant Science 139(1):105-115
54. Lira R, Rodríguez-Jiménez C, Alvarado JL, Rodríguez I, Castrejón J, Domínguez-Mariani A. (1998). Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. Acta Botánica Mexicana 42: 43-77
55. Lira R, Villaseñor JL, Ortiz E. (2002). A proposal for the conservation of the family Cucurbitaceae in Mexico. Biodiversity and Conservation 11:1699–1720
56. Lu Y, Wu YR, Han B. (2005). Anaerobic induction of isocitrate lyase and malate synthase in submerged rice seedlings indicates the important metabolic role of the glyoxylate cycle. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 37(6):406–414
57. Mandava NB (1985). The chemistry of allelopathy. American Chemical Society 268:33-54
58. Mason-Sedum W, Jessop RS, Lovett JV (1986). Different phytotoxicity among species and cultivars of the *Genus brassica* to wheat. I. laboratory and field screening of species .Plant soil 93:3-16
59. Miernyk JA, Trelease RN, Choinski JS (1979). Malate synthase activity in cotton and other ungerminated oilseeds. Plant Physiology 63:1068-1071
60. Moon BY, Kim MC, Kim TH, Park JH, Lee CH, Cho SH. (2007). Expression of rice acyl-CoA oxidase isoenzymes in response to wounding. Plant Physiology 164:665-668
61. Mooney BP, Miernyk JA, Randall DD (2002). The complex fate of alpha-ketoacids. Annual Review of Plant Biology 53:357-375

62. Muscolo A, Panuccio MR, Sidari M (2001). The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *Plant Growth Regulation* 35:31-35.
63. Nelson DL, Cox MM (2005). *Lehninger: Principles of Biochemistry* 4<sup>th</sup> Ed. W. H. Freeman Co. New York 190-225, 521-554, 601652.
64. Pedrol N, González L, Reigosa MJ. (2006). Allelopathy and abiotic stress. In: Reigosa MJ, Pedrol N, González L (eds) *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*, Springer. The Netherlands 171–209
65. Plaxton WC, Hu Z (1996). Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from leaves of the castor oil plant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 333(1):298-307
66. Podesta EE, Plaxton WC (1994). Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* 194:374-380.
67. Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez-Moreiras AM, González L. (2002). Stress and allelopathy. In *allelopathy from molecules to ecosystems*. Eds. Reigosa MJ, Pedrol, N. Science Publishers, Inc. USA 231-256
68. Rice EL (1984) *Allelopathy*. Academic Press, Orlando, FL
69. Rimando AM, Dayan FE, Czarnota MA, Weston LA, Duke SO (1998) A new photosystem II electron transport inhibitor from *Sorghum bicolor*. *Journal of Natural Products* 61:927–930
70. Rizvi, S. J. H. and Rizvi, V. (1992). *Allelopathy. Basic and applied aspects*. Chapman and Hall, London 480
71. Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie AR. (2003). Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology* 133:84–99.

72. Rolland F, Moore B, Sheen J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14:185-S205.
73. Romagni JG, Allen SN, Dayan FE (2000a). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology* 26:303-313
74. Romagni JG, Duke SO, Dayan FE (2000b). Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. *Plant Physiology* 123:725–732
75. Romero-Romero MT. (2000). Efectos del estrés aleloquímico provocado por los metabolitos secundarios de plantas alelopáticas sobre el patrón de síntesis de proteínas de la raíz de *Cucurbita pepo* L. *Phaseolus vulgaris*, L. *Zea mays* L. y *Lycopersicon esculentum*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
76. Romero-Romero T, Anaya AL, Cruz-Ortega R. (2002). Screening for effects of phytochemical variability on cytoplasmic protein synthesis pattern of crop plants. *Journal of Chemical Ecology* 28:617-629.
77. Romero-Romero MT. (2003). Estudio comparativo entre el efecto del estrés aleloquímico y el estrés hídrico en las raíces de *Lycopersicon esculentum* L. (Solanaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Biología Experimental. Facultad de Ciencias, UNAM.
78. Romero-Romero T, Sánchez-Nieto S, Anaya AL, Cruz-Ortega R. (2005). Allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum*: a comparative study. *Plant Science* 168:1059-1066.
79. Srere PA, Brazil H, Gonen L (1963). The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chemica Scandinavica* 17:5129-5134.
80. Srivastava A, Juttner F, Strasser RJ (1998) Action of the allelochemical on photosystem II. *Biochemica and Biophysics Acta* 1364:326-336.
81. Testerink C, van der Meulen RM, Oppeijk BJ (1999). Differences in spatial expression between 14-3-3 isoforms in germinating barley embryos. *Plant Physiology* 121:81–87

82. Tovar-Mendez A, Miernyk JA, Randall DD (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *European Journal of Biochemistry* 270:1043-1049.
83. Veramendi J, Fernie AR, Leisse A, Willmitzer L, Trethewey RN. (2002). Potato hexokinase 2 complements transgenic Arabidopsis plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Molecular Biology* 49:491-501
84. Villasenor JL, Espinosa FJ. (1998). *Catálogo de malezas de México*. Ediciones Científicas Universitarias. Serie Texto Científico Universitario. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
85. Walker RP, Leegood RC. (1995). Purification, and phosphorylation in vivo and in vitro, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 362:70–74
86. Walker RP, Chen ZH, Acheson RM, Leegood RC (2002). Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the c4 plant guinea grass *Plant Physiology* 128:165–172
87. Waller GR. (1987). *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. American Chemical Society Symposium Series 330. Washington, D.C.
88. Weir TL, Park S-W, Vivanco JM (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7:472-479.
89. Yanik T, Donaldson RP. (2005). A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 435:243–252
90. Yu JQ, Matsui Y (1997). Effect of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 23:817–827.
91. Zhao X, Zheng GW, Niu XM, Li WQ, Wang FS, Li SH. (2009). Terpenes from *Eupatorium adenophorum* and their allelopathic effects on Arabidopsis seeds germination. *Journal of Agriculture Food and Chemistry* 57 (2):478-482.