

**UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**



Título: Efecto alelopático inducido por diferentes fracciones procedentes del extracto acuoso de orozuz (*Phyllanthus strigosus*) sobre la germinación de maíz.

Autora: Danelys Jova Sáez.

Tutores: MSc. Rafael Sosa Martínez.

Ing. Maykel Hernández Aro.

2005-2006

En la investigación se inició el estudio de diferentes fracciones obtenidas por procesos cromatográficos en Gel filtración logrando identificar la presencia cualitativa de los grupos flavonoides y coumarinas.

Los efectos alelopáticos de diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso de orozuz (*Phyla strugulosa*) sobre la especie maíz (*Zea mays* L.) fue evaluado empleando técnicas de germinación in vitro. Las fracciones fueron administradas en base al valor de los sólidos totales disueltos empleando agua como control positivo.

Las fracciones evaluadas estimularon el proceso de germinación con carácter lineal e inhibieron el desarrollo de las raíces y los tallos. De esta manera las fracciones acuosas pueden ser consideradas fracciones bioactivas del extracto. Todo lo anterior aporta evidencias sustanciales del potencial alelopático del orozuz.

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	2
1.1 Consideraciones generales sobre la planta.	3
1.1.1 Distribución geográfica.	3
1.1.2 Descripción botánica.	3
1.1.3 Usos reportados de la planta.	4
1.2 Alelopatía. Concepto y generalidades.	5
1.2.1 Antecedentes sobre la alelopatía.	7
1.2.2 Los aleloquímicos.	9
1.2.3 Naturaleza de los compuestos alelopáticos.	9
1.2.4 Biosíntesis de los agentes alelopáticos.	10
1.2.5 Modo de liberación de las sustancias alelopáticas.	11
1.2.6 Mecanismos de acción de agentes alelopáticos.	11
1.2.7 Influencia de los factores ambientales.	14
1.2.8 Otros factores que influyen en el fenómeno alelopático.	15
1.2.9 La Alelopatía en la agricultura.	16
1.2.10 Investigaciones para evaluar el efecto alelopático en plantas.	18
1.3 Proceso de germinación.	19
1.3.1 Fases del proceso de germinación.	20
1.3.2 Factores que afectan el proceso de germinación.	22
1.3.2.1 Factores internos.	22
1.3.2.2 Factores externos.	25
1.4 Aspectos moleculares relacionados con efectos alelopáticos de compuestos fenólicos.	27
1.4.1 Peroxidación lipídica y cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática.	28
1.4.2 Oxidación de poliaminas.	28
1.4.3 Señales indicadoras.	31
1.4.4 Inducción de fenilamina amonioliasa (PAL) y síntesis de lignina.	33
1.4.5 Inhibición del crecimiento.	34
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.	36
2.1 Fase experimental.	36
2.2 Procesamiento de la planta.	36
2.3 Tamizaje fitoquímico.	36
2.3.1 Preparación del extracto acuoso y métodos de fraccionamiento.	38
2.4 Análisis cromatográfico.	39
2.4.1 Cuantificación.	39
2.5 Ensayos de germinación.	39
2.6 Sustancia de referencia.	40
2.7 Diseño de experimento.	40

2.8 Esquema de tratamiento y fracciones empleadas en el ensayo. ----	40
2.9 Procedimiento experimental. -----	41
2.10 Registro. -----	41
2.11 Criterios de evaluación. -----	42
2.12 Procesamiento estadístico. -----	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. -----	43
3.1 Tamizaje fitoquímico.-----	44
3.2 Resultados del fraccionamiento.-----	44
3.3 Análisis espectrofotométrico ultravioleta-visible.-----	45
3.4 Análisis espectrofotométrico de las fracciones agrupadas.-----	46
3.5 Evaluación del proceso de germinación.-----	46
3.5.1 Análisis del peso fresco de semillas y el % de germinación.-----	46
3.5.2 Análisis de la germinación.-----	47
3.6 Análisis del crecimiento radicular.-----	48
3.6.1 Análisis del peso fresco y seco de la raíz.-----	49
3.7 Análisis del crecimiento longitudinal del tallo.-----	50
3.8 Análisis del peso fresco y seco de semillas germinadas.-----	51
3.9 Análisis de la biomasa.-----	52
CONCLUSIONES.-----	54
RECOMENDACIONES.-----	55
BIBLIOGRAFIA.-----	56
ANEXOS.	

Introducción.

Las sustancias biológicamente activas que causan efectos alelopáticos están relacionadas con las plantas a través de diferentes procesos: exudación, descomposición de biomásas. La descomposición de los residuos procedentes de las plantas son recursos ricos en aleloquímicos. Uno de los principales grupos que componen estas sustancias son los compuestos fenólicos y dentro de ellos los ácidos hidroxifenólicos, derivados del ácido cinámico y benzoico.

Los efectos negativos de la influencia de estas sustancias sobre los procesos fisiológicos de las plantas, aunque sus bases moleculares no estén totalmente dilucidadas, está determinado por la inhibición del crecimiento en determinada etapa del ciclo biológico a través de la disminución de la fotosíntesis, la respiración y la relación agua – absorción de iones.

Se conoce que bajo determinadas condiciones de cultivo (casas de cultivos) y reiteradas etapas de cosechas de la misma especie, disminuye la productividad de la misma y ello se encuentra relacionado con el incremento de aleloinhibidores sobre el sustrato.

Los compuestos fenólicos presentes en el tejido vegetal, regulan los niveles de auxinas por influencia de la oxidasa IAA y esta actividad de la enzima correlaciona negativamente con el crecimiento de las plantas.

El estudio de las potencialidades alelopáticas ha tenido sus orígenes en prácticas comunes, pero en los últimos años las plantas con actividad alelopática han centrado las expectativas como fuente de nuevas entidades moleculares con amplia repercusión en la agricultura. La investigación basada en sólidos conocimientos científicos se ha dirigido hacia el conocimiento de las bases moleculares que soportan la acción de estos agentes aleloquímicos.

Los metabolitos secundarios con actividad alelopática son de naturaleza química muy variada y variedades de estas especies han sido identificadas en los últimos años como son los ácidos fenólicos y sus derivados coumarinas, flavonoides y glucósidos entre otros.

Phyla strigulosa u orozuz, como se le conoce en Cuba, es una planta que se tiene como maleza invasiva. Es muy conocida, por sus propiedades medicinales y como uno de los ingredientes en la decocción (betún) con que se rocía el tabaco destinado a capadura, lo cual a contribuido a estimular las investigaciones con esta especie en el contexto del proyecto entre la Facultad de Ciencias Agrícolas y Biológicas Aplicadas de la Universidad de Gante, Bélgica y la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente analizado se ha decidido realizar una evaluación de los efectos alelopáticos de esta especie sobre la germinación de maíz, proponiéndonos los siguientes objetivos:

Objetivo general: Realizar una evaluación de los efectos alelopáticos inducidos por diferentes fracciones procedentes del extracto acuoso de orozuz (*Phyla strigulosa*) sobre la germinación de maíz. (*Zea mays* L.)

Objetivos específicos:

1. Fraccionar y caracterizar cualitativamente los grupos de sustancias presentes tanto en el extracto acuoso como en las fracciones procedentes de este extracto.
2. Identificar las fracciones con actividad alelopática provenientes del extracto acuoso. sobre la germinación de maíz (*Zea mays* L.)

1.1 Consideraciones generales de la planta.

Familia: Verbenaceae.

Nombre científico: *Phyla strigulosa* var *sericea*.

Nombres comunes:

- Revienta caballos.
- Oro azul.
- Mazorquilla.
- Yerba de sapo.
- Yerba dulce.

1.1.1 Distribución geográfica.

Se puede localizar en América continental desde México hasta Argentina y en Las Antillas. En Cuba se localiza en las provincias occidentales: Pinar del Río, Habana, Matanzas (nuevo mundo: Los Arabos), en las provincias centrales: Villa Clara (Caibarién), Cienfuegos (Soledad), Sancti Spíritus (Sierra de Banao; Topes de Collantes), Camagüey (Paso de Lesca) y en la zona oriental del país: Holguín, Santiago de Cuba, Guantánamo (San Antonio del Sur).

Crece en formaciones herbáceas con humedad permanente o temporal.

1.1.2 Descripción botánica.

Se considera una hierba perenne, rastrera, radicante en los nudos, de 30 – 90 cm de alto y hasta 30 cm de diámetro. Ramas glabras a estrigiloso-canescientes por pelos todos o en su mayoría malpighiáceos, al igual que en hojas, pedúnculos y brácteas. Las hojas son opuestas, el pecíolo es de 2 - 8 mm de largo; la lámina de consistencia firme, obovada a espatulaza, a veces subrómica, de 1 – 7.2 x 0.6 -2.5 cm., glabra o estriguloso-pubérula en ambas caras,

redondeada, obtusa o subaguda; base cuneiforme y estrechada en el pecíolo, margen aserrado por encima de la mitad por dientes agudos o acuminados; nervios por lo general no visibles, raramente algo hundidos en la haz y prominentes en el envés. Inflorescencias multifloras, globosas a cilíndricas, de 1 – 2.5 cm de largo, 2 por nudo; el pedúnculo mide de 1 – 11.5 cm. de largo, es pubérulo a glabra; brácteas no claramente seriadas, obovadas a subrómico-cuneiformes, glabras o cilíndricas, mucronato-acuminadas. Cáliz de 2 mm de largo, 2 – partido, 2 – carinado, con quillas pubérulas. Corola rosado-púrpura, morada o blanca, con garganta amarilla; tubo de 2 – 2.5 mm de largo, estriguloso por fuera. Fruto ovoide de 1.5 mm de diámetro, pubérulo. ⁽¹⁾

Variabilidad.

Especie variable en cuanto al tamaño e indumento de las hojas, lo cual se ha utilizado para distinguir taxones intraespecíficos. En Cuba están presentes: *Phyla strigulosa* var. *Strigulosa* (hojas de mayor 1.5 por 1 cm., no canescentes) y *Phyla strigulosa* var. *Seríceea* (hojas por lo general de menos de 1.5 (-2.5) por 1 cm., conspicuamente estriguloso-canesciente en el envés.

1.1.3 Estudios realizados sobre la planta.

Usos reportados.

Se usa con fines medicinales contra espasmos, trastornos de los bronquios, del estomago y de los riñones, la reuma, el asma, la fiebre, afecciones de la piel y por sus propiedades carminativas, diuréticas, emenagogas y pectorales. Sirve de alimento a los conejos. La planta completa es uno de los ingredientes de la decocción (betún) con que se rocía el tabaco destinado a capadura.

1.2. Alelopatía. Concepto y generalidades.

En la naturaleza, las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos con los cuales han co-evolucionado. La presión de selección ejercida por estos a lo largo del proceso evolutivo provocó el desarrollo en los vegetales de numerosas rutas de biosíntesis a través de las cuales sintetizan y acumulan en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios. Se sabe que muchos de los mismos juegan un importante rol en interacciones complejas entre organismos vivos en el entorno natural. Entre ellos existen sustancias que producidas por una planta le proporcionan beneficios al provocar determinados efectos sobre otras plantas o animales. Estas sustancias se denominan aleloquímicos y el fenómeno en el cual están involucradas se designa con el nombre aleloquimia. Un tipo de aleloquimia lo constituye la Alelopatía.

El término alelopatía (del griego *allelon* = uno al otro, del griego *pathos* = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) fue utilizado por primera vez por Molisch ⁽²⁾ para referirse a los efectos perjudiciales o benéficos que son ya sea directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos, que liberados por una planta, ejercen su acción en otra.

Siguiendo esta definición, en todo fenómeno alelopático existe una planta (donor) que libera al medio ambiente por una determinada vía (por ej. lixiviación, descomposición de residuos, etc.) compuestos químicos los cuales al ser incorporados por otra planta (receptora) provocan un efecto perjudicial o benéfico sobre germinación, crecimiento o desarrollo de esta última. Los compuestos citados que desencadenan el proceso se denominan compuestos, agentes o sustancias alelopáticas.

La definición abarca tanto los efectos perjudiciales como benéficos. Es necesario puntualizar que muchas sustancias con actividad alelopática tienen efectos benéficos a muy bajas concentraciones y, superado un determinado umbral, actúan negativamente sobre la planta receptora. Aun así, predomina en la literatura especializada la descripción de efectos negativos. Por otra parte, el término definido por Molisch ⁽²⁾ incluye a hongos y otros microorganismos, además de las plantas superiores, puesto que en su tiempo todos ellos se consideraban miembros del reino vegetal. La confusión aumenta si se tiene en cuenta que muchos agentes alelopáticos, además de tener un efecto sobre plantas, también lo tienen sobre otros tipos de organismos distantes a éstas tales como herbívoros e insectos fitófagos.

Evolutivamente es lógico esperar por selección natural la preferencia por modelos de defensa basados en sustancias que presentan actividad biológica sobre un amplio espectro de organismos, lo cual implica para la planta una mayor eficiencia en el uso de su energía. Esto condujo a ciertos autores a ampliar el alcance de la alelopatía. Grummer ⁽³⁾ propuso una designación específica para los diferentes agentes alelopáticos basada en el tipo de planta productora de los mismos y el tipo de planta aceptora. Sin embargo no tuvo amplia aceptación.

En opinión de Einhellig ⁽⁴⁾ esto sería consecuencia de que frecuentemente la fuente emisora de un compuesto alelopático no se conoce *a priori* con claridad. Por ejemplo, compuestos liberados por plantas superiores pueden ser alterados por microorganismos en el suelo antes de que ejerzan su acción sobre la planta receptora. A su vez es difícil establecer la fuente de producción de un compuesto aislado en el medio edáfico. También la terminología sugerida no permite aclarar el rol de la sustancia con actividad biológica cuando ésta tiene múltiples funciones afectando varios tipos de organismos. En base al análisis

anterior se tendrá en cuenta el criterio enunciado por Müller ⁽⁵⁾, el cual utiliza el término alelopatía para referirse a los efectos nocivos de un compuesto químico producido por una planta superior sobre otra planta superior.

En la literatura a veces al analizar las interacciones entre plantas superiores existió cierta confusión en el uso de los términos alelopatía y competencia. Algunos biólogos han considerado que la alelopatía es parte de la competencia.

La competencia entre plantas involucra la reducción en la disponibilidad de algún factor del entorno, debido a su utilización por un individuo vegetal, que es requerido también por otra planta que comparte el mismo hábitat. Entre estos factores citemos el agua, los nutrientes minerales y la luz.

En cambio la alelopatía implica la liberación al entorno por parte de una planta de un compuesto químico que ocasiona un efecto sobre otra. Por tanto, el efecto detrimental en crecimiento y desarrollo en la competencia es debido a la reducción en la disponibilidad de recursos comunes, mientras que en la alelopatía tiene su origen en compuestos químicos liberados por una planta que afectan a otra.

Estos conceptos son diferentes entre sí pero desde un punto de vista ecofisiológico se pueden considerar estrechamente ligados y complementarios en su efecto. Para evitar confusiones se utiliza el término interferencia para designar al efecto total de una planta sobre otra, es decir, la suma de efectos debidos a los fenómenos de competencia y alelopatía.

1.2.1. Antecedentes sobre la alelopatía.

El término alelopatía fue acuñado en 1937 por Molisch ⁽³⁾, para indicar cualquier tipo de interacción bioquímica entre plantas o microorganismos. La alelopatía difiere de la competencia en el sentido de que los mecanismos interactivos entre los microorganismos o plantas, involucra la adición de algún químico por una

especie en el ambiente de otra, en vez de la remoción de un recurso del ambiente.

La alelopatía es un componente muy importante de la interferencia entre plantas, por la excreción de sustancias químicas producidas por una planta y liberadas en el ambiente de otras, sufriendo una reducción o anulación en su desarrollo por una inhibición tóxica causada por las secreciones.

Cada vez existen más pruebas de que las plantas tienen una influencia mutua desfavorable por otros medios que no son la competencia por los elementos nutritivos, el agua y la luz. Uno de los medios de ésta, es la producción de sustancias tóxicas alelopáticas por las raíces de las plantas. Hay experimentos que demuestran que determinados extractos vegetales inhiben la germinación de las semillas o disminuyen el crecimiento de otra especie vegetal a la que se hace crecer en medios nutritivos.

En experimentos hechos en invernaderos con cultivos sucesivos en un mismo suelo, se ha identificado cierto número de sustancias tóxicas alelopáticas que son producidas por raíces vivas o que son productos de descomposición de las raíces. En algunos casos, la descomposición de las raíces ha producido más compuestos tóxicos que las raíces vivas. Por ejemplo, las raíces de linaza contienen un glicósido cianógeno, la linamerina, que durante la descomposición excreta pequeñas cantidades de ácido cianhídrico. Raíces de avena han producido escopoletina, glicósido de escopoletina, y otras toxinas.

En la alelopatía entre plantas, intervienen toxinas vegetales tanto de las hojas como de las raíces; por ejemplo, *Encelia farinosa* A. Gray ex Torr., contiene 3-acetil-6-metoxibenzaldehído en todas las partes de la planta. Este compuesto es tóxico para ciertas plantas que por lo común conviven con dicha especie en hábitats desérticos. Otros estudios demostraron que extractos de raíces de *Agropyron repens*, y mezclas de suelo y raíces de *A. repens* inhiben el crecimiento vegetal o impiden la germinación de las semillas de ciertas plantas.

Debe señalarse también, que la alelopatía tiene la potencialidad para ocasionar inhibición o promover el crecimiento de otras especies. Rice ⁽⁷⁾ en su texto titulado “Allelopathy” incluye varios ejemplos de ambas interacciones nocivas y benéficas.

1.2.2. Los aleloquímicos.

Los aleloquímicos están presentes en casi todos los órganos vegetales. Su concentración depende de la genética, la edad, el tipo de órgano o tejido, y de las condiciones del entorno, incluyendo las formas de estrés físico y biológico que puedan afectar el desarrollo de la planta.

Un mismo compuesto puede aparecer en distintas partes del vegetal y en diferentes concentraciones, las cuales dependen del órgano y de la edad de la planta. La concentración de algunos aleloquímicos -tales como los alcaloides, los terpenos y los glicósidos cianogénicos- es mayor durante los estadios tempranos de las plántulas y parecen ser producidos solo durante la expansión de las hojas.

Como la mayoría de los aleloquímicos son también autotóxicos, las plantas desarrollan métodos para almacenarlos sin ser afectadas. Muchos están localizados dentro de ciertos tejidos, células u organelos, con el fin de aislarlos de los procesos metabólicos críticos en el organismo que los produce. En otros casos las toxinas se acumulan en una forma inactiva, y se transforman químicamente antes de su liberación.

1.2.3. Naturaleza de los compuestos alelopáticos.

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

- Compuestos alifáticos.
- Lactonas saturadas.
- Lípidos y ácidos grasos.
- Terpenoides.
- Glicósidos cianogénicos.
- Compuestos aromáticos (fenoles, derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, quinonas, coumarinas, flavonoides, taninos).

1.2.4 Biosíntesis de los agentes alelopáticos.

La mayoría de los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios derivados de las rutas del acetato-mevalato o del Shikímico. Entre los metabolitos que provienen de la ruta metabólica del acetato-mevalato se encuentran terpenos, esteroides, ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos, cetonas, ácidos grasos insaturados simples, ácidos grasos de cadena larga, poliacetilenos, naftoquinonas, antroquinonas, quinonas complejas y Floroglucinol. De la vía metabólica del ácido Shikímico provienen fenoles simples, derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, coumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhidrinas, algunos derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados. Existen también compuestos como los flavonoides, en cuya síntesis participan metabolitos de las dos rutas. Como es previsible, las concentraciones de estos compuestos en los tejidos varían según el ritmo de biosíntesis, almacenamiento y degradación. También son afectados por los balances internos reguladores de crecimiento vegetal y otros factores bióticos y abióticos. Es importante tener presente que no siempre los detalles de la biosíntesis de estos compuestos son conocidos. ^(4; 8)

1.2.5. Modo de liberación de las sustancias alelopáticas.

Se puede afirmar que el modo de liberación de un agente alelopático depende de su naturaleza química. Las plantas superiores liberan regularmente compuestos orgánicos por volatilización de sus superficies y a través de lixiviados de hojas y exudados de raíces. Eventualmente, los constituyentes químicos de todos los organismos son liberados al entorno a través de procesos de descomposición, incorporándose a la matriz del suelo. Por tanto existen 4 vías principales de liberación al entorno de los aleloquímicos:

- Volatilización.
- Lixiviación.
- Exudación.
- Biodegradación.

1.2.6. Mecanismo de acción de agentes alelopáticos.

Existen dos formas fundamentales de acción de los aleloquímicos sobre las plantas receptoras: directa e indirecta. ⁽⁹⁾ Las alteraciones de las propiedades del suelo y su efecto sobre la nutrición y actividad de las poblaciones de plantas y microorganismos respectivamente, constituyen formas indirectas de actuar los aleloquímicos. En cambio, el efecto que ejercen sobre el crecimiento y el metabolismo vegetal se considera el modo de acción directa por el cual los mismos pueden perjudicar o beneficiar a las plantas o microorganismos.

Entre los mecanismos de acción directa mas estudiados se encuentran:

- Alteraciones hormonales.

Los niveles de ácido indol acético (AIA) pueden reducirse o incrementarse en dependencia de las concentraciones de compuestos fenólicos que existan en el

medio. Monohidroxifenoles como el ácido p-Hidroxibenzóico, Vaníllico, p-Cumárico y Siríngico pueden reducir la disponibilidad de AIA al promover su descarboxilación. Por otra parte di y polifenoles tales como el ácido clorogénico, caféico, felúrico y protocatético sinergizan el crecimiento inducido por AIA, suprimiendo la degradación de la hormona. Estos efectos sobre los niveles de la auxina no tienen la misma repercusión en diferentes plantas, ni sobre los distintos órganos de las plantas, pues la sensibilidad de los órganos varia, siendo las raíces las más susceptibles, seguido de las yemas y luego los tallos.⁽¹⁰⁾

También algunos de estos mismos compuestos fenólicos inhiben la acción de otras fitohormonas como las giberelinas y el ácido Abscísico (ABA). En el caso de las giberelinas se puede producir la unión a la molécula hormonal como tal o un bloqueo de los procesos mediados por ella. Respecto al ABA, fitohormona asociada a condiciones de estrés, pueden ser antagónicamente inhibidas por la coumarina y varios flavonoides, los cuales estimulan el crecimiento inducido por el ácido Giberélico. Por todo lo anterior se presupone que en gran parte de los casos la toxicidad producida por estos ácidos sería debida a la interferencia que provocan en la actividad normal de las auxinas.⁽¹¹⁾

- Efecto sobre la actividad enzimática.

Existen muchos compuestos alelopáticos con capacidad de modificar ya sea la síntesis o la actividad de enzimas tanto in vivo como in Vitro. La mayoría de estas sustancias han demostrado un efecto dual sobre la regulación de la actividad enzimática. Por ejemplo, plántulas de maíz tratadas con ácido felúrico mostraron un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasas y ácido indol acético oxidasa) junto con una elevación de enzimas de la ruta del ácido Shikímico tales como fenilamina amonio liasa y la cinamil alcohol deshidrogenada involucrada en la síntesis de compuestos

fenilpropanoides. También al ácido felúrico se le atribuye la inhibición de enzimas hidrolíticas tales como amilasa, maltasa, invertasa, proteasa y fosfatasa ácida involucradas en la movilización de material de alimento.

- Efecto sobre la fotosíntesis.

El efecto de los agentes alelopáticos que influyen sobre la inhibición de la fotosíntesis, no necesariamente acontece en los eventos primarios del proceso como la captación de la luz y el transporte de electrones, también resulta de una modificación de los niveles de clorofila o por cierre estomático y la subsecuente reducción en la provisión de CO₂ vital para la producción de fotosintatos. Por ejemplo en Soya los ácidos Felúrico, Vainílico y p-Coumárico reducen el contenido de clorofila, sin embargo sobre Sorgo estas mismas sustancias igualmente concentradas no provocan esa disminución. Ciertos flavonoides parecen interferir en la organización funcional o estructural de los cloroplastos; por ejemplo el Kaenpherol actúa aparentemente como un inhibidor de la transferencia de energía, impidiendo la producción de ATP. Otras especies arbóreas poseen polifenoles capaces de reducir la producción de 2,6-Diclorofenol, inhibiendo las reacciones fotoquímicas en los cloroplastos. ⁽¹²⁾

- Efecto de la respiración.

Entre los compuestos fenólicos el orden de mayor a menor actividad está formado por quinonas > flavonoides > coumarinas > ácidos fenólicos. Las quinonas Sorgoleone y Juglona son efectivos inhibidores de la respiración a muy bajas concentraciones, el Sorgoleone afecta a través del transporte de electrones, mientras que la Juglona afecta la incorporación mitocondrial de oxígeno. Flavonoides tales como la Quercetina, Naringenina y Umbeliferota inhiben la producción de ATP en las mitocondrias. Otros compuestos como los fenoles, por el contrario estimulan la fijación de oxígeno. ⁽¹³⁾

- Efecto sobre procesos asociados a membranas.

Los derivados de los ácidos benzoico y cinámico tienen profundos efectos sobre las membranas. Son capaces de provocar cambios en la polaridad lo cual provocaría alteraciones en la estructura y permeabilidad de las mismas. Otras sustancias como el ácido hidroxibutírico, presente comúnmente en rastros, provocan efectos similares. Los ácidos fenólicos tienen un efecto directo sobre la incorporación de iones. Así, los ácidos benzoicos y cinámicos implicados en fenómenos alelopáticos inhiben el ritmo de incorporación de fósforo y potasio en raíces cortadas. También algunos flavonoides inhiben la absorción mineral. La inhibición de las ATPasas de membranas y la alteración en la permeabilidad de las mismas es otra de las formas con que se puede contribuir en la incorporación mineral. ⁽¹⁴⁾

1.2.7. Influencia de los factores ambientales.

Las reacciones que las toxinas sufren en el suelo son ampliamente controladas por factores edáficos, así como por el régimen de composición, estado nutricional o contenido de materia orgánica que influyen en el tipo y cantidad de exudados.

Se plantea que el régimen de composición del suelo ayuda a determinar si la descomposición que tiene lugar es aeróbica o anaeróbica, lo cual contribuye a determinar el rango de actividad microbiana, mientras la naturaleza y cantidad de materia orgánica del suelo advierte si la adsorción que ha tenido lugar es simple o compleja.

Las toxinas que son liberadas al suelo están disponibles para ser tomadas por la planta receptora, la mayoría de los aleloquímicos pueden ser tomados por las plantas, pero estas pueden discriminar ciertas toxinas sobre la base de su tamaño (peso molecular) y/o otros factores como son:

- Efecto de la radiación luminosa.
- Deficiencia mineral.
- Estrés hídrico.
- Cambios de temperatura.
- Influencia de agentes externos (plantas, animales, plagas, enfermedades).
- Edad de la planta (Estados fisiológicos de la planta).
- Factores genéticos.

Una vez absorbidas las toxinas, pueden ser trasladadas al sitio donde sea capaz de interferir al metabolismo. Si la traslación es bloqueada las toxinas pueden ser inefectivas. Si las toxinas son absorbidas y trasladadas, pero no destoxificadas dentro de la planta, las mismas pueden interferir en la planta hospedera metabolismo.

1.2.8. Otros factores que influyen en el fenómeno alelopático.

Bowen ⁽¹⁵⁾, citado por Puente ⁽¹³⁾, plantea que para que se produzcan efectos alelopáticos ya sean de carácter positivo o negativo, directos o indirectos, la concentración de las sustancias aleloquímicas es de gran importancia. Las actividades biológicas en plantas receptoras de aleloquímicos constituyen una respuesta dependiente de la concentración de entrada. La respuesta es de estimulación o atracción, con bajas concentraciones de aleloquímicos y de inhibición o rechazo al incrementarse estas. ^(16; 18)

Blum ⁽⁹⁾ citado por Pazmiño ⁽¹¹⁾ señala tres factores fundamentales que influyen directamente en el fenómeno:

1. Sensibilidad de la especie.
2. Liberación de la toxina al medio.

3. Actividad e interacciones bióticas y abióticas que ocurren en el suelo con la toxina (microorganismos, temperatura, pH, etc.).

No obstante a todo esto, para que todo fenómeno alelopático, de cualquier naturaleza ejerza su efecto como tal debe cumplir dos condiciones:

1. Que exista en el suelo suficiente cantidad o concentración del compuesto alelopático.
2. Que el aleloquímico entre en contacto directo o interactúe de alguna forma con una planta susceptible.^(13; 18)

1.2.9. La alelopatía en la agricultura.

En las últimas décadas la producción agrícola ha dependido de un amplio conjunto de productos agroquímicos, creados para controlar un complejo sistema de plagas integrado por arvenses, insectos y organismos patógenos. El uso de estos compuestos químicos son frecuentemente evaluados desde el punto de vista de su eficacia en el control de plagas y enfermedades, con la finalidad de aumentar o sostener los rendimientos de cosecha. Sin embargo, en los últimos años, las evidencias acumuladas están demostrando que el uso intenso de estos químicos a largo plazo, amenaza la capacidad de mantener la producción de la agricultura en el futuro próximo.⁽²⁰⁾ Sumado a lo anterior, el uso inadecuado y excesivo de agroquímicos está asociado con los problemas siguientes:

- Contaminación de fuentes de agua.
- Desarrollo de resistencia de los organismos a los pesticidas.
- Pérdida de eficacia de los agroquímicos.
- Desarrollo de pestes secundarias.

- Contaminación por residuos en los alimentos.
- Problemas de salud en los agricultores que realizan las aplicaciones.
- Aumento en el costo de producción de los cultivos.
- Contaminación en general del ambiente.

La conciencia creciente de estos problemas ha estimulado la búsqueda de maneras para reducir o eliminar el uso de agroquímicos sintéticos. Esto ha originado que recientemente se centre la atención en la alelopatía, especialmente donde los impactos de los aleloquímicos son positivos y han contribuido al desarrollo de estrategias alternativas de control de plagas y enfermedades.⁽²⁰⁾ Estas estrategias se han categorizado como:

1. Prevención de impactos negativos.
2. Explotación de impactos positivos.
3. Manejo y desarrollo de plantas alelopáticas para suprimir arvenses.
4. Desarrollo de aleloquímicos como reguladores de crecimiento o herbicidas.
5. Combinaciones de los enfoques anteriores.

El reemplazo de los costosos y dañinos agroquímicos sintéticos es seguramente una meta de la agricultura sostenible; por lo que, para que la alelopatía pueda funcionar como una herramienta efectiva en el desarrollo de los agroecosistemas, debe evaluarse en un contexto más amplio de la sostenibilidad agrícola.

1.2.10. Investigaciones para evaluar el efecto alelopático en plantas.

Según Sampietro⁽⁸⁾, la investigación en alelopatía comprende dos fases fundamentales:

- 1. Fase biológica – ecológica:** Durante esta primera fase se selecciona la planta que manifiesta alguna interacción específica con otra. Esto puede realizarse a través de la observación de algunos sucesos como: zonas de suelo desnudo alrededor de una vegetación arbustiva, cobertura vegetal rala bajo un grupo de árboles, persistencia de un estado particular dentro de la asociación vegetal o reducción del rendimiento en un cultivo infestado con una maleza agresiva en particular. El siguiente paso es determinar si la causa del suceso manifestado es debido a la competencia, a la alelopatía o a otros procesos (patógeno vegetal, plaga, etc.). normalmente si el efecto observado no puede atribuirse a variables físicas ambientales (pH, temperatura, nutrientes minerales y contenido de agua), ni a los procesos indicados anteriormente, se considera como fenómeno causante a la alelopatía.
- 2. Fase química – analítica:** Si un efecto fitotóxico puede demostrarse a través de los bioensayos, se procede al aislamiento e identificación de los aleloquímicos responsables. La disponibilidad de técnicas tales como las cromatografías en capa fina, en papel, líquida de alta presión (HPLC) y gaseosa acoplada a espectrómetro de masas, permiten la identificación de la mayoría de los compuestos aislados. Debe detectarse su presencia en la parte del entorno (aire, suelo, solución del suelo) a través de la cual estaría ejerciendo su acción en la concentración adecuada para causar la inhibición de la planta receptora. Esto es especialmente problemático, ya que los compuestos biológicamente activos frecuentemente se encuentran en concentraciones muy bajas en el suelo, lo cual dificulta la extracción y detección de los mismos.

También Xuan ⁽²¹⁾ en sus trabajos metodológicos más actuales aborda más profundamente las formas de proceder metodológicamente para obtener resultados adecuados según los objetivos propuestos. En las mismas puntualiza por ejemplo, el por ciento de germinación (> 70 %) adecuado que deben tener

las semillas que se vayan a utilizar como blanco para detectar el efecto alelopático. En este mismo sentido plantea las características que debe presentar la planta blanco, siendo plantas como Lechuga (*Lactuca sativa* L.), Rábano (*Raphanus sativus* L.) o *Lepidium sativum* L. son especies muy sensibles a los efectos alelopáticos y por tanto pueden servir eficazmente como blanco en los bioensayos normales.

1.3. Proceso de germinación.

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. Además, es uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse, tanto en el tiempo como en el espacio. Para que la semilla cumpla con su objetivo es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de valerse por si misma y, finalmente convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfogénéticos cuyo resultado final es la germinación de las semillas.

Para que el proceso de germinación, es decir, la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla, tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y, una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula.

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provoca la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula.

Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, incluso cuando se encuentran en condiciones favorables. Esto es debido a que las semillas se encuentran en estado de latencia. Por ello, mientras no se den las condiciones adecuadas para la germinación, la semilla se mantendrá latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que llegado un momento, pierda su capacidad de germinar.

Cuando una semilla germina, la primera estructura que emerge de la mayoría de las especies, después de la rehidratación de los diferentes tejidos es la radícula. En aquellas semillas, en las que la radícula no es el primer acontecimiento morfológico, se consideran otros criterios para definir la germinación como: la emergencia del coleoptilo en granos de cereales; la obtención de plantas normales; o el aumento de la actividad enzimática, tras la rehidratación de los tejidos.

1.3.1. Fases del proceso de germinación.

En el proceso de germinación podemos distinguir tres fases:

- **Fase de hidratación:**

La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

- **Fase de germinación:**

Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

- **Fase de crecimiento:**

Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria.

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto interesante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla. La primera fase se produce tanto en semillas vivas y muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas. Por tanto los factores externos que activan el metabolismo, como la temperatura, tienen un efecto estimulante en la última fase.

En las dos primeras fases de la germinación los procesos son reversibles, a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir.

1.3.2. Factores que afectan a la germinación.

Los factores que afectan a la germinación los podemos dividir en dos tipos:

Factores internos (intrínsecos): propios de la semilla; madurez y viabilidad de las semillas.

Factores externos (extrínsecos): dependen del ambiente; agua, temperatura y gases.

1.3.2.1 Factores internos.

Entre los factores internos que afectan a la germinación estudiaremos la madurez que presentan las semillas y la viabilidad de las mismas.

- **Madurez de las semillas.**

Decimos que una semilla es madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico.

La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras de la semilla han completado su desarrollo, dándose por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo. También, se la relaciona con la deshidratación de los diferentes tejidos que forman la semilla. La madurez se suele alcanzar sobre la misma planta, sin embargo, existen algunas especies que diseminan sus semillas antes de que se alcance, como ocurre en las semillas de Ginkgo biloba o de muchas orquídeas, que presentan embriones muy rudimentarios, apenas diferenciados.

Aunque la semilla sea morfológicamente madura, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar porque necesitan experimentar aún una serie de transformaciones fisiológicas. Lo normal es que requieran la pérdida de

sustancias inhibidoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras. En general, necesitan reajustes en el equilibrio hormonal de la semilla y/o en la sensibilidad de sus tejidos para las distintas sustancias activas.

La madurez fisiológica se alcanza al mismo tiempo que la morfológica, como en la mayoría de las especies cultivadas; o bien puede haber una diferencia de semanas, meses y hasta años entre ambas.

- **Viabilidad de las semillas.**

La viabilidad de las semillas es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento.

Atendiendo a la longevidad de las semillas, es decir, el tiempo que las semillas permanecen viables, pueden haber semillas que germinan, todavía, después de decenas o centenas de años; se da en semillas con una cubierta seminal dura como las leguminosas. El caso más extremo de retención de viabilidad es el de las semillas de *Nelumbo nucifera* encontradas en Manchuria con una antigüedad de unos 250 a 400 años.

En el extremo opuesto tenemos las que no sobreviven más que algunos días o meses, como es el caso de las semillas de arce (*Acer*), sauces (*Salix*) y chopos (*Populus*) que pierden su viabilidad en unas semanas; o los olmos (*Ulmus*) que permanecen viables 6 meses.

En general, la vida media de una semilla se sitúa entre 5 y 25 años.

Las semillas pierden su viabilidad por causas muy diversas. Podríamos pensar que mueren porque agotan sus reservas nutritivas, pero no es así, sino que conservan la mayor parte de las mismas cuando ya han perdido su capacidad germinativa.

Una semilla será más longeva cuanto menos activo sea su metabolismo. Esto, a su vez, origina una serie de productos tóxicos que al acumularse en las semillas produce a la larga efectos letales para el embrión. Para evitar la acumulación de esas sustancias bastará disminuir aún más su metabolismo, con lo cual habremos incrementado la longevidad de la semilla. Ralentizar el metabolismo puede conseguirse bajando la temperatura y/o deshidratando la semilla. Las bajas temperaturas dan lugar a un metabolismo mucho más lento, por lo que las semillas conservadas en esas condiciones viven más tiempo que las conservadas a temperatura ambiente. La deshidratación, también alarga la vida de las semillas, más que si se conservan con su humedad normal. Pero la desecación tiene unos límites; por debajo del 2%-5% en humedad se ve afectada el agua de constitución de la semilla, siendo perjudicial para la misma.

En resumen podemos decir que, para alargar más tiempo la vida de una semilla, ésta debe conservarse en las siguientes condiciones: mantenerla seca, dentro de unos límites; temperaturas bajas y, reducir al mínimo la presencia de oxígeno en el medio de conservación.

1.3.2.2. Factores externos.

Entre los factores ambientales más importantes que inciden en el proceso de germinación destacamos: humedad, temperatura y gases.

- **Humedad.**

La absorción de agua es el primer paso, y el más importante, que tiene lugar durante la germinación; porque para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos.

La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. En

condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Por ello, hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal; siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico.

Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión.

- **Temperatura.**

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. Del mismo modo, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. Por ello, las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar aunque las demás condiciones sean favorables.

La temperatura mínima sería aquella por debajo de la cual la germinación no se produce, y la máxima aquella por encima de la cual se anula igualmente el proceso. La temperatura óptima, intermedia entre ambas, puede definirse como la más adecuada para conseguir el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible

Las temperaturas compatibles con la germinación varían mucho de unas especies a otras. Sus límites suelen ser muy estrechos en semillas de especies adaptadas a hábitats muy concretos, y más amplios en semillas de especies de amplia distribución.

Las semillas de especies tropicales suelen germinar mejor a temperaturas elevadas, superiores a 25 °C. Las máximas temperaturas están entre 40 °C y 50 °C (*Cucumis sativus*, pepino, 48 °C). Sin embargo, las semillas de las especies de las zonas frías germinan mejor a temperaturas bajas, entre 5 °C y 15 °C.

Ejemplo de ello son *Fagus sylvatica* (haya), *Trifolium repens* (trébol), y las especies alpinas, que pueden germinar a 0 °C. En la región mediterránea, las temperaturas más adecuadas para la germinación son entre 15 °C y 20 °C.

Por otra parte, se sabe que la alternancia de las temperaturas entre el día-noche actúan positivamente sobre las etapas de la germinación. Por lo que el óptimo térmico de la fase de germinación y el de la fase de crecimiento no tienen por que coincidir. Así, unas temperaturas estimularían la fase de germinación y otras la fase de crecimiento.

- **Gases.**

La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O₂ y CO₂. De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas.

La mayoría de las semillas germinan bien en atmósfera normal con 21% de O₂ y un 0.03% de CO₂. Sin embargo, existen algunas semillas que aumentan su porcentaje de germinación al disminuir el contenido de O₂ por debajo del 20%. Los casos mejor conocidos son: *Typha latifolia* (espadaña) y *Cynodon dactylon* (grama), que germinan mejor en presencia de un 8% de O₂. Se trata de especies que viven en medios acuáticos o encharcados, donde la concentración de este gas es baja. El efecto del CO₂ es el contrario del O₂, es decir, las semillas no pueden germinar se aumenta la concentración de CO₂.

Para que la germinación tenga éxito, el O₂ disuelto en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión. A veces, algunos elementos presentes en la cubierta seminal como compuestos fenólicos, capas de mucílago, macroesclereidas, etc. pueden obstaculizar la germinación de la semilla por que reducen la difusión del O₂ desde el exterior hacia el embrión.

Además, hay que tener en cuenta que, la cantidad de O₂ que llega al embrión disminuye a medida que aumenta disponibilidad de agua en la semilla.

A todo lo anterior hay que añadir que la temperatura modifica la solubilidad del O₂ en el agua que absorbe la semilla, siendo menor la solubilidad a medida que aumenta la temperatura.

1.4. Aspectos moleculares relacionados con efectos alelopáticos de compuestos fenólicos.

1.4.1 Peroxidación lipídica y cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática.

Diferentes factores de stress como la temperatura, infección por agentes patógenos y/o presencia de metales pesados, inducen cambios sobre la membrana plasmática. ^(22; 23; 24; 25) Estos factores incrementan el intercambio de sustancias de la célula por modificación de las propiedades de la membrana a través de los cambios en sus componentes estructurales. Un similar efecto es observado cuando semillas de pepino son tratadas con diferentes concentraciones de ácidos fenólicos 0.1 – 0.5 mM ⁽²⁶⁾. Los efectos sobre la permeabilidad de la membrana plasmática de los derivados del ácido cinámico (ácido telúrico y p – coumárico) fueron más acentuados que los producidos por los derivados del ácido benzoico (p – hidroxibenzoico y vanílico) y además estos cambios son proporcionales a la peroxidación lipídica. ⁽²⁷⁾

1.4.2. Oxidación de poliaminas.

Bajo condiciones de stress se produce modificación en los niveles de polimerasas, las cuales protegen a las membranas plasmáticas de la peroxidación lipídica; acción protectora demostrada por la presencia de espermidina y espermita y en grado menor por putrescina ^(28; 29; 30; 31). En estas condiciones de stress, tanto el incremento como la disminución de los niveles de poliaminas son reportados y ello depende de los niveles de los factores stresantes, su duración y tolerancia de la planta. ^(32; 33; 34; 35; 36; 37; 38)

En estudios realizados sobre la raíz de pepino solamente fueron detectados: la putrescina y espermidina. ⁽³⁹⁾ Además al añadirle ácidos fenólicos a estas raíces se ha encontrado que disminuyen drásticamente los niveles de ambas poliaminas en las primeras horas de stress, y simultáneamente ocurre un incremento en la actividad de la enzima di- y poliamina oxidasa responsable de la oxidación de las poliaminas. Considerando de hecho que la putrescina generalmente ocurre en el protoplasto mientras la poliamina oxidasa y espermidina son localizadas en la pared celular. ^(40; 41; 42; 43; 44; 36)

La putrescina ha sido transportada por el apoplasto por oxidación enzimática, la posibilidad de tal transporte es analizado por Bagni y Pistocchi ⁽⁴⁵⁾, quienes demostraron que el transporte de la putrescina ocurre a través del proceso plasmolema sobre el principio de un mecanismo de intercambio y su acoplamiento con iones Ca^{2+} .

Un incremento del contenido de iones Ca^{2+} es observado en el citoplasma bajo la influencia de varios factores de stress como efecto de su traslación a través de los canales de calcio en la membrana plasmática. La permeabilidad de estos canales puede ser regulada por cambios en el potencial eléctrico de la

membrana ⁽⁴⁶⁾. Tales cambios en los potenciales eléctricos de la membrana plasmática, también fueron observados bajo la influencia de ácidos fenólicos. ^{(47;}
⁴⁸⁾ En otro sentido Lieberman ⁽⁴⁹⁾ encontró Ca^{2+} acumulado en células de raíces para el caso de guisantes, bajo el efecto de ácido coumárico, p – hidroxibenzóico y vainílico aplicado a 0.5 mM. Simultáneamente, ellos observaron la filtración de otros iones de la raíz, concluyendo que dicha afectación está relacionada con daños sobre la membrana plasmática. De lo que se puede inferir que los cambios de potencial del plasmolema, así como la localización de iones Ca^{2+} y la putrescina pueden también ocurrir en la raíz de pepino, aunque este problema no ha sido estudiado.

Por otra parte, la rapidez con la cual ocurre la oxidación de la putrescina en la raíz de pepino (en las primeras horas de stress), hace suponer que esta amina no se origina en la vacuola sino en el citoplasma, resultados que se sustentan por los resultados obtenidos por Di Tomaso ⁽⁵⁰⁾, quien encontró que los niveles de putrescina en la raíz de cultivos de maíz, fue transportada del citoplasma al apoplasto en pocos minutos. Sin embargo el transporte de la putrescina desde la vacuola ocurre posterior a las 7 horas después de comenzar el experimento. Ya en las 3 primeras horas de stress, una cierta cantidad de putrescina se mantiene sin oxidar.

Como se menciona al principio, los incrementos observados sobre la permeabilidad de la membrana plasmática en cultivos de pepino tratados con compuestos fenólicos fue proporcional a la Peroxidación lipídica. ⁽²⁷⁾

La acción degradante sobre los fosfolípidos podría ser iniciada por la presencia de los radicales libres producidos durante la oxidación de los compuestos fenólicos, por otro lado Appel ⁽⁵¹⁾, demostró que la actividad de los compuestos fenólicos sobre células depende de su grado de oxidación.

Durante el traslado de compuestos fenólicos exógenos en células de plantas, puede ocurrir la oxidación de estos compuestos durante su paso a través de las paredes celulares, donde numerosas enzimas demuestran afinidad por estos compuestos, tal como peroxidasas, lacasas o tirosinasas.

Bartosz ⁽⁵²⁾ describió la presencia de un intermediario durante el estado de transición de la forma reducida del fenol a la forma oxidada quinona, dado por la semiquinona, la cual dona un electrón a la molécula de oxígeno formando el radical anión superóxido, paralelamente la superóxido dismutasa convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y un radical hidroxilo responsable más tarde de iniciar la peroxidación lipídica sobre los fosfolípidos presentes en la pared celular de la membrana plasmática. Por su parte Politycka, Wojcik-Wojtkowiak y Pudelski ⁽⁵³⁾ reportan que el incremento de la cantidad de compuestos fenólicos sobre el sustrato en cultivo de pepino, pudiera iniciar un incremento de la peroxidación lipídica en el plasmolema, precedido por unas transformaciones oxidativas del fenol vía oxidación enzimática en las paredes celulares y que además de peróxido de hidrógeno mediados por peroxidasas oxidativas durante la oxidación del fenol pudiera estar dado por poliaminas en las paredes celulares catalizadas por di- y poliamina oxidasas.

Los agentes inductores de estas oxidasas pueden tener sus orígenes fundados en la presencia del ión fenolato enlazados a especies metálicas generados por la disociación del protón hidrógeno del grupo hidroxilo del fenol reportado por Appel. ⁽⁵¹⁾

Posteriormente Yanagisawa ⁽⁵⁴⁾, como resultado de sus investigaciones sobre poliaminas oxidasas plantea que especies metálicas divalentes tales como Zn^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} muestran efectos inhibidores de poliamina oxidasas.

Sin embargo, Chaudhuri ⁽⁵⁵⁾, describe como resultado de la purificación y caracterización de diamina oxidasa procedentes de embriones de arroz iones metálicos divalentes tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} y Hg^{2+} poseen efectos inhibidores sobre la actividad enzimática de la diamina oxidasa.

1.4.3. Señales indicadoras.

La producción de especies reactivas de oxígenos (radicales libres) así como la peroxidación de membranas bajo condiciones de stress pueden causar efectos de deterioros. Tanto el peróxido de hidrógeno como los productos de la peroxidación lipídica son indicadoras de señales sobre efectos stresantes. Como reporta Foyer ⁽⁵⁶⁾, el peróxido de hidrógeno puede actuar tanto como agente oxidante o reductor, sin embargo ausencia de catálisis metálica o enzimas oxidoreductasas evidencian una pequeña reactividad y pueden fácilmente moverse en las células e infiltrarse a través de la membrana plasmática.

Considerando de hecho que varios factores stresantes, incrementan los niveles de peróxido de hidrógeno y que su presencia induce cambios climatéricos, se plantea la hipótesis de que el peróxido de hidrógeno puede ser una señal indicadora, el modelo hipotético de activación por etapas inducido por peróxido de hidrógeno y presentado por Eshdat ⁽⁵⁷⁾ liderea a través de la peroxidación lipídica activada por lipogenasas, esta enzima puede además participar en el proceso de reacción en la síntesis de etileno. Sin embargo no fueron determinadas la actividad enzimática de los niveles de etileno en raíz de pepino tratados con ácidos fenólicos, pero se pudiera tomar como un indicador del efecto inducido por esta vía sobre las membranas plasmáticas observado en las primeras 5 horas de stress donde ocurrió un ligero incremento de la actividad de la lipogenasa. ^(58; 27)

En estudios sobre la influencia del etileno y los stress en plantas reportados por Morgan ⁽⁶⁰⁾ y Yang ⁽⁶⁰⁾ informan que la producción de etileno genera cambios parecidos en las propiedades de la membrana plasmática y es también responsable del stress en plantas. La producción de etileno ocurre en la célula, la cual responde al factor stress mediado por una desestabilización funcional de transición de la membrana cuyo resultado tributa a pequeñas fugas de iones y por otro lado incrementos del factor stress han demostrado perceptibles e irreversibles daños sobre la membrana plasmática y disminuye la producción de etileno y estos cambios producidos guardan una estrecha correlación con la actividad enzimática de la lipogenasa. ⁽⁵⁸⁾

Resultados obtenidos por Lieberman ⁽⁴⁹⁾ y Yang ⁽⁶⁰⁾, también consideran que el etileno es un compuesto con características de señales, el cual bajo condiciones de stress es responsable de mucho de los procesos climatéricos.

También Lieberman ⁽⁴⁹⁾ y Yang ⁽⁶⁰⁾ reportan que su síntesis puede ocurrir debido a la descomposición espontánea de ácidos grasos generando peróxidos durante la reacción de radicales libres en los cuales según Kacperska ⁽⁶⁰⁾ y Lynch ⁽⁶²⁾, la lipogenasa puede participar.

La producción de etileno es precedida por la síntesis de su precursor ácido 1-aminociclopropano-1- carboxil (AAC) y/o el incremento en la actividad de la enzima responsable para la producción de ese precursor, (AAC) sintetasa, ocurriendo bajo condiciones de stress a través de la síntesis de Novo. Bajo condiciones de stress libre, el mRNA del ACC sintetasa es bloqueado por poliaminas. ⁽⁶³⁾ También Yang ⁽⁶⁰⁾ planteó que el etileno es producido a través de la oxidación de ACC mediada tanto por reacciones enzimáticas como monoenzimáticas ocurridas bajo condiciones de stress las cuales son concomitantes con la producción de especies reactivas de oxígeno (radical superóxido e hidroxilo).

1.4.4. Inducción de fenilamina amonioliasa (PAL) y síntesis de lignina.

En raíz de pepino, una disminución en los niveles de poliamina puede contribuir sobre factores de la transcripción del RNA o de ACC sintetasa. ⁽⁶⁴⁾

Sin embargo, en raíces de pepinos tratadas con derivados del ácido cinámico, se reportan evidencias de la acción del llamado síndrome de stress por etileno, detectándose incrementos en la actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL) e intensificación en la síntesis de lignina. ^(65; 66; 67; 59;68)

Las evidencias de la fenilalanina amonioliasa en la raíz de pepino pueden estar determinadas por la acción del etileno. Su presencia fue demostrada por los resultados del estudio conducido usando inhibidores de la síntesis de etileno, ácido aminooxiacético, el cual elimina el efecto estimulador de los ácidos felúrico y p-coumárico sobre la actividad PAL y síntesis de lignina, estos resultados también evidencian una participación de la influencia del ácido p-coumárico exógeno en la síntesis de lignina, ya que existen pequeños incrementos en el contenido de ligninas en las raíces tratadas con este ácido, a pesar de la no inducción de la actividad PAL del glucósido fenilpropanoide en las diferentes etapas que precede a la síntesis de numerosos derivados del ácido cinámico, los cuales pueden ser incorporados en las estructuras macromoleculares de la pared del polisacáridos y la lignina causando una rigidez de las paredes y por tanto limitando el crecimiento celular. ^(69; 70; 71; 72)

Algunos autores destacan que la prevalencia de las ligninas ocurren exclusivamente en la pared celular secundaria y plantean que la reposición de pequeñas cantidades de lignina en la pared primaria pueden limitar extensivamente la pared celular y en consecuencia inhibir el alargamiento celular. ⁽⁷³⁾

1.4.5. Inhibición del crecimiento

La aplicación de ácido felúrico y p-coumárico en la raíz de pepino, origina incrementos tanto de la actividad PAL y el contenido de lignina, pero inhiben el crecimiento (63). Mientras que la aplicación de ácido p-Hidroxibenzóico y vainílico producen diferentes efectos.

La diferencia en cuanto al efecto de los derivados del ácido cinámico y benzóico indican que la inhibición del crecimiento puede ser causada por la inducción de la síntesis de lignina, aspecto que es confirmado por el hecho de que la raíz de pepino tratada con ácido felúrico y p-coumárico reducen la actividad de interacción iónica de la enzima siringaldazina peroxidasa, la cual participa en la lignificación. Esta enzima se encuentra principalmente en la pared celular pero también es localizada en el citoplasma (37, 43, 47). Las macromoléculas de lignina son originadas a partir del alcohol cinámico y los últimos estadios de lignificación son iniciados por la enzima peroxidasa fenoxil radical dependiente. A pesar de que la procedencia del peróxido de hidrógeno durante la reacción de oxidación del fenol por peroxidasa no es bien conocido, parece que la NADH oxidación puede ser catalizada por enzimas de la pared celular. La generación de peróxido de hidrógeno en la pared celular por intermedio de peroxidasa NADH-dependiente fue estimulada por ácidos fenólicos y Mn^{2+} . Esta reacción de carácter complejo libera radical anión superóxido, cuya dismutación produce peróxido de hidrógeno.

Los resultados también revelaron que el ácido fenólico y p-coumárico incrementan la actividad de peroxidasa NADH dependiente comparado con la influencia de los ácidos p-hidroxibenzóico y vainílico.

En raíz de pepino, la procedencia del peróxido de hidrógeno por siringaldazina peroxidasa pudiera ser peroxidasa NADH dependiente. Un significativo incremento en la actividad de la siringaldazina peroxidasa fue reportado en

raíces tratadas con ácido felúrico y p-coumárico mientras que en raíces tratadas con ácido benzóico y vainílico se produjeron insignificantes incrementos en la actividad de la enzima estudiada.⁽²⁷⁾

Similares resultados fueron observados para peroxidasas procedentes de tejido de tabaco, las cuales despliegan una alta afinidad por los ácidos fenólico y p-coumárico y no por los ácidos p-hidroxibenzóico y vainílico. Y además señala que las raíces de pepino bajo la influencia de ácido p-hidroxibenzóico demostraron fenoxidación lipídica y daños en la membrana señalando que estos daños ocurren en menor escala pero los mismos están precedidos por la oxidación fenólica.

2.1. Fase Experimental

El trabajo fue realizado en los laboratorios de Fisiología Vegetal y Alelopatía pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Facultad de Química-Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas.

2.2. Procesamiento de la Planta

El material vegetal de *Orozuz*, se obtuvo a partir del material fresco colectados en terrenos del municipio de Santa Clara, en horas de la mañana. Posteriormente fue secado a la sombra, para luego ser triturado mediante un molino desfoliador marca VEB NOSSER 8225 NOSSEN hasta obtener un polvo fino de tamaño de partícula adecuado.

2.3. Tamizaje fitoquímico

Para la realización del tamizaje fitoquímico se informan en la literatura variados esquemas de trabajo que comprenden a su vez el uso de diferentes solventes de extracción.

Es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente ya que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir de forma determinante:

1. La época de recolección.
2. El estado vegetativo de la planta.
3. Las variaciones ocurridas por una deficiente recolección, secado y/o conservación.
4. La concentración de los metabolitos.

5. La solubilidad en el solvente empleado.
6. Las interferencias de otros metabolitos.

El esquema que proponemos utiliza la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente, con la finalidad de lograr el mayor agotamiento de la droga, ensayándose en cada extracto los metabolitos que de acuerdo a su solubilidad pueden ser extraídos en estos solventes.

Generalmente pueden partirse de 10 a 20 gramos de droga fresca o seca y emplear un volumen de solvente equivalente a 10 veces el peso de la droga.

La extracción se realizó por maceración de la droga pulverizada, por un tiempo de 24 h, a cada uno de los extractos obtenidos se le realizan los ensayos reflejados a continuación:

Extracto etéreo

- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Sudán III (ácidos grasos).

Extracto etanólico

- Ensayo de Resinas
- Ensayo de Liebermann- Burchard (triterpenos y/o esteroides)
- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Nihidrina (aminoácidos libres)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Kedde (glicósidos cardiotónicos)

- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Borntrager (quinonas)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)
- Ensayo de antocianidinas

Extracto acuoso

- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)
- Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Principios amargos
- Ensayo de mucílagos.

El estudio fitoquímico se realizó utilizando las técnicas de tamizaje fitoquímico establecidas por el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana.

2.3.1. Preparación del extracto acuoso y métodos de fraccionamiento.

Se tomaron 10 gramos del polvo obtenido en (2.1.) y se añadió en 200 ml de solución hidroalcohólica al 70 % para realizar la extracción durante 24 horas. El extracto hidroalcohólico obtenido, se rotoevapora a sequedad en equipo Heidolph (Laborota 4000) bajo las siguientes condiciones.

- Temperatura del baño 50 °C
- Frecuencia de giro del balón 50 rpm
- Vacío 0.6 l/h

El residuo obtenido se redissuelve en 30 ml de agua destilada y desionizada con las siguientes características: pH = 4.60, TDS = 16 mg/L, conductividad = 17.64 μ S/cm, Salinidad = 0 %, potencial REDOX= 174 mV

2.4. Análisis cromatográfico.

Todo proceso de separación involucra la división de una mezcla compleja en un número de fracciones discretas, a través de eluciones continuas de una columna cromatográfica, las fracciones colectadas dependen de la muestra en particular y los objetivos de la separación. El esquema de fraccionamiento se basó en la cromatografía de gel filtración sobre Sephadex G-10 fino (Pharmacia Fine Chemicals). El soporte fue equilibrado a temperatura ambiente con agua desionizada pH = 4.60, TDS = 16 mg/L, conductividad = 17.64 μ S/cm, Salinidad = 0 %, potencial REDOX= 174 mV durante 3 horas.

Las fracciones son eluidas mediante régimen isocrático, se colectaron fracciones de 3 ml a una velocidad de flujo de 1 ml/min. A las fracciones se le determinaron pH, TDS, Conductividad, Salinidad y registro espectrofotométrico UV- visible, para determinar en cuales fracciones existen señales indicativas de la presencia de compuestos y poder correlacionar estas con las posibles respuestas biológicas obtenidas en los bioensayos.

2.4.1 Cuantificación.

Durante el aislamiento de productos naturales conocidos, es posible obtener algunos estimados del recobrado en cada proceso a través de técnicas analíticas de rutina que involucran el uso de estándares pero en el caso de principios activos desconocidos como el nuestro, es necesario realizar alguna medida cuantitativa de las características físico- químico indicadoras de la composición del medio, por ello se determinaron: pH, TDS, conductividad,

potencial redox y salinidad, usando un equipo pH- metro marca inoLab, mientras que los registros ultravioleta-visibles se determinaron en un espectrofotómetro marca Pye Unicam SP8-400.

2.5. Ensayos de germinación

Partiendo de los resultados previos obtenidos por Hernández ⁽⁷⁷⁾ del extracto acuoso de la especie Orozua (*Phyllanthus strigosus var sericeus*) sobre la germinación de maíz, decidimos utilizar como modelo de especie vegetal a evaluar semillas de Maíz (*Zea mays* L.), seleccionadas mediante ensayos de germinación, con un 88% de germinación, y tratadas con cloro al 1% para su desinfección.

Se tomaron 10 semillas desinfectadas, se colocaron sobre papel de filtro en cámara húmeda, utilizando placas Petri (DI =150 mm, h= 25 mm) previamente esterilizadas.

Las placas durante el experimento fueron mantenidas a temperatura ambiente (26 -28 °C) y luz natural. Diariamente se realizaron observaciones por un período de siete días, finalmente se realizó un conteo general de la germinación, longitud de los tallos y raíces y además se evaluó masa seca total.

2.6. Sustancia de referencia

Como sustancia de referencia (testigo) se utilizó el agua, indicadora de la incidencia de germinaciones espontáneas y viabilidad.

2.7. Diseño de experimento.

El diseño experimental completamente aleatorio estuvo formado por 5 grupos de tratamiento, conformados por un testigo (agua) y 4 fracciones. Se utilizaron 300 semillas en total, usando 60 semillas por tratamiento.

2.8. Esquema de tratamiento y fracciones empleadas en el ensayo.

Grupos de tratamiento:

Grupo1: Testigo (agua)

Grupo 2: Fracción 1.

Grupo 3: Fracción 2.

Grupo 4: Fracción 3.

Grupo 5: Fracción 4

Sustancia de ensayo.	Grupo de tratamiento.	TDS (mg/L)	Cantidad de semillas.
H ₂ O	1	16	15
F 1	2	1512	15
F 2	3	170	15
F 3	4	53	15
F 4	5	16	15

Tabla # 1. Grupos de tratamientos.

Las semillas fueron colocadas en placas Petri sobre papel de filtro y las sustancias de ensayo fueron administradas en volumen de 5 ml sobre el papel para lograr que el mismo este totalmente humedecido y lograr un contacto eficiente (semilla- sustancia).

2.9. Procedimiento experimental.

La conducción de la parte experimental del ensayo se realizó en 1 semana. Las semillas fueron depositadas sobre los papeles de filtro humedecidos con la sustancia de ensayo y se comenzó la observación de signos cada 24 horas, con vista a tabular los datos.

El procedimiento empleado para obtener los resultados del ensayo consiste en:

- Medición del por ciento de germinación.
- Medición de la longitud del tallo.
- Medición de la longitud de la raíz.

- Medición de la materia fresca.
- Medición de la materia seca.

2.10. Registro.

Medición del % de germinación: a los 7 días se desmonta el experimento y se cuenta el número de semillas germinadas y se le haya el % de germinación total y para cada tratamiento.

Medición de la longitud del tallo: se toma una regla y se mide desde la base del tallo hasta la punta de este.

Medición de la longitud de la raíz: para ello se mide la longitud de la raíz más larga, considerada como la raíz principal.

Medición de la materia fresca: después de separados los tallos y las raíces de la semilla, se pesan cada uno de los grupos por separado.

Medición de la materia seca: se ponen a secar los tallos, raíces y semillas en una estufa por 3 días a 65 °C, luego se procede al pesado de las muestras.

2.11. Criterios de evaluación. .

Se comparan los índices medidos anteriormente en la germinación del maíz bajo la influencia de las diferentes fracciones y se comparan con los valores obtenidos en el grupo control.

2.12. Procesamiento estadístico.

Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 4.1 para la determinación de los resultados.

3.1. Tamizaje fitoquímico

Según los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico mediante la extracción con tres solventes: hexano, etanol, agua y la realización de 15 ensayos para igual número de metabolitos diferentes, solo se encontró resultados positivos para:

Alcaloides.

Coumarinas.

Ácidos grasos.

Triterpenos y/o esteroides.

Flavonoides.

Carbohidratos reductores.

Fenoles y/o taninos.

Por lo que de acuerdo con estos resultados se puede pensar que la potencialidad alelopática este relacionada con alguno de los miembros que componen estos 7 grupos de familia de compuestos.

3.2. Resultados del fraccionamiento

Teniendo en cuenta que los posibles efectos alelopáticos reportados por Hernández ⁽⁷⁷⁾, pueden estar relacionados con algunos de los miembros que conforman los 7 grupos de familia de compuestos detectados. Se sometió el extracto acuoso a un proceso de fraccionamiento mediante Gel filtración sobre Sephadex G-10. Durante el desarrollo cromatográfico se pudo observar la formación de una banda de color amarillo no intenso. La evaluación cromatográfica a través de la caracterización químico-física de las alícuotas permitió agrupar en 4 fracciones las 30 alícuotas obtenidas, cuyos valores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de los parámetros químico-físicos calculados para las fracciones obtenidas sobre Gel filtración.

# de fracción	pH	Potencial REDOX (mV)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	TDS (mg / L)	Salinidad (%)	Composición
I	3.52	240	1699	1512	0.7	-
II	4.42	181.3	190.8	170	0	Flavonoides Coumarinas
III	4.32	194.7	59.6	53	0	Flavonoides Coumarinas
IV	4.34	184.3	17.6	16	0	Flavonoides Coumarinas

De estos resultados podemos inferir que existe una disminución con carácter lineal en cuanto a los valores de las conductividades eléctricas y sólidos totales disueltos (TDS) para las cuatro fracciones y un marcado efecto en la disminución del pH para la fracción I con respecto a las restantes, por otra lado podemos hablar a favor de una composición común en cuanto a composición para las fracciones II, III y IV (Flavonoides y coumarinas)

3.3. Análisis Espectrofotométrico UV- visible de las fracciones individuales.

Como los compuestos descritos con actividad alelopática presentan características estructurales que les permiten desarrollar bandas más o menos intensas, comprendidas entre 200 - 400 nm, estas fueron analizadas en la región comprendida con el fin de compararlas, poder seleccionarlas y agrupar las de señales similares. En los espectros obtenidos se observan bandas intensas en el intervalo de 280- 320 nm con máximos de absorbancia en 320 nm y 290

nm; pero esta segunda de menor intensidad, que a partir de la fracción 27 se invierte esta relación (Figura 1. Anexo 3), las fracciones con espectros UV-visibles y parámetros químico-físicos similares se reúnen en fracciones (cuatro fracciones) para futuros ensayos biológicos. (Ver Anexo 3.)

3.4. Análisis Espectrofotométrico UV- visible de las fracciones agrupadas.

En los espectros correspondientes a las fracciones agrupadas se observan 3 bandas, dos comprendidas en la región entre 280 y 320 nm y una no intensa en 240 nm. (Figura 2 Anexo 3)

3.5. Evaluación del ensayo de germinación

3.5.1. Análisis del peso fresco de semillas germinadas y % de germinación

La absorción de agua es el primer paso, y el más importante, que tiene lugar durante la germinación; porque para que la semilla inicie su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La semilla seca muestra una escasa actividad metabólica, aumentando después de iniciada la imbibición, la respiración y la movilización de las sustancias de reserva que son los procesos metabólicos más importantes relacionados con la germinación en nuestro caso, como se muestra en el Gráfico 1.

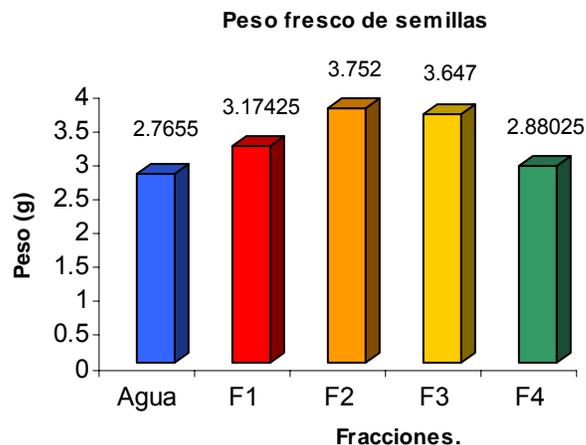


Gráfico 1. Peso fresco de semillas germinadas.

Las fracciones de mayor masa fresca y por tanto más embebidas fueron la F2 y F3, sin que exista entre ellas significación estadística y sí con el testigo (Gráfico 4 Anexo 2) lo que denota una posible activación de las actividades respiratorias funcionales (glucólisis, ciclo de la pentosa fosfato y ciclo de Krebs) en las semillas embebidas.

Esta activación producirá una serie de compuestos intermediarios del metabolismo vegetal, necesarios para la intensa actividad metabólica que tiene lugar durante la germinación. ⁽²⁰⁾

3.5.2. Análisis de la germinación.

Estos resultados demuestran que existe una correlación prácticamente lineal entre la proporción de agua embebida con el por ciento de semillas germinadas inducidas por las fracciones, con valores comprendidos entre 98.30 y 100 % respectivamente (Gráfico 2), mostrando una estimulación de la germinación que comparadas con el testigo, muestran diferencias que resultan significativas.

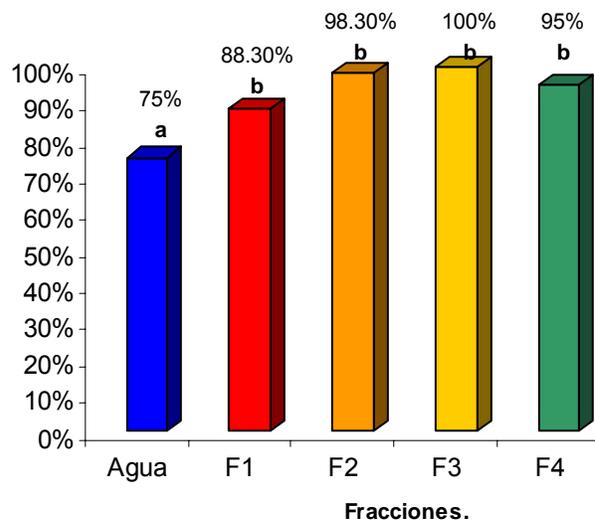


Gráfico 2. % de germinación de las semillas.

3.6. Análisis del crecimiento radicular.

Estos resultados (Gráfico 3) muestran el efecto que sobre el desarrollo radicular tiene la aplicación de diferentes fracciones F1, F2, F3, F4 de orozuz. En las cuales se observó un efecto inhibitorio de carácter lineal decreciente del desarrollo radicular en maíz, con diferencias significativas respecto al testigo y de magnitud inversa con respecto a los valores de sólidos totales disueltos, resultados que no concuerdan con los reportados por Hernández ⁽⁷⁷⁾; pero si con los reportados por Aguilar ⁽⁷⁸⁾ al aplicar restos de tabaco a parcelas de pepino y cuyos resultados mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento radicular de un 25 %. Por otro lado Anaya y Pelayo ⁽⁷⁹⁾ al aplicar extractos de hojas de M. Jalapa L. sobre pepino, muestran que la inhibición del crecimiento radicular fue de un 74 %. Debemos señalar que además de ser especies diferentes (Pepino y Maíz) estos efectos son dependientes de la naturaleza y concentración de los agentes alelopáticos presentes.

Por otro lado podemos inferir que como en la raíz se produce mayor cantidad de oxidasas, el efecto inhibitorio pueda estar estrechamente relacionado con esta enzima.

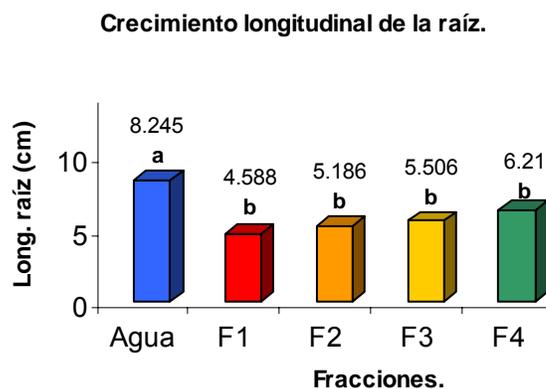


Gráfico 3. Crecimiento longitudinal de la raíz.

3.6.1. Análisis del peso fresco y seco de la raíz.

La aplicación de las diferentes fracciones no mostró efectos marcados sobre el peso fresco y seco de la raíz. (Gráficos 4 y 5)

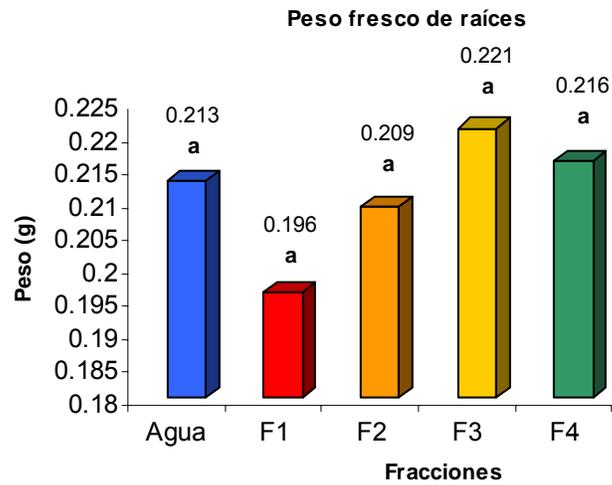


Gráfico 4. Peso fresco de las raíces.

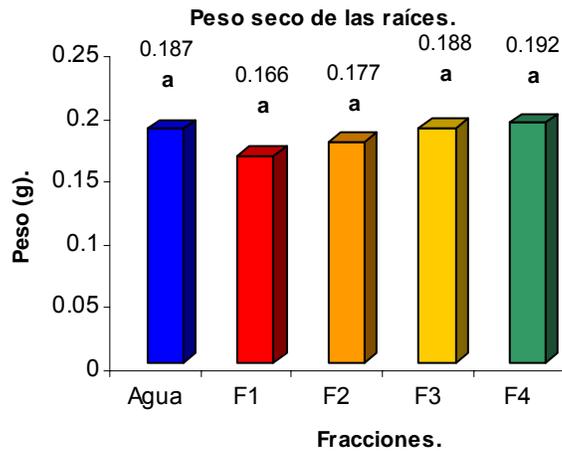


Gráfico 5. Peso seco de las raíces.

3.7. Análisis del crecimiento longitudinal del tallo.

El efecto alelopático de algunas especies como estimuladores del crecimiento ha sido también explicado por la presencia de altos niveles de compuestos fenólicos como, el ácido Caféico, Felúrico, Protocatéico, y dentro de los flavonoides la Quercetina ⁽²²⁾. Sin embargo, las inhibiciones producidas en otros cultivos más sensibles, en especies receptoras, han sido reportados por Blum ⁽⁹⁾ citado por Pazmiño ⁽¹¹⁾. Se especifica que algunos órganos son más sensibles que otros, como son las raíces respecto a las yemas y tallos. ⁽¹⁰⁾

Dentro de las sustancias biológicamente activas que causan efectos alelopáticos se encuentran, como mencionábamos anteriormente, los compuestos fenólicos, ácidos hidroxifenólicos, derivados del ácido cinámico y benzóico. Las influencias negativas de estos compuestos sobre los procesos fisiológicos en las plantas, aunque no estén totalmente investigadas sus bases moleculares, están vinculadas con la inhibición del crecimiento a través de modificaciones en los niveles de hormonas del crecimiento, así como la presencia de especies reactivas que pueden originar daños en las membranas plasmáticas.

En este sentido, en los estudios realizados con metodología experimental y modelos biológicos diferentes que los reportados por Politycka ⁽²⁷⁾, se observó una disminución en la elongación del tallo en las plantas que germinaron en contacto con las fracciones y marcadamente para la fracción I. (Gráfico 6) Este aspecto es interesante y concuerda con lo reportado en la literatura. Pues se plantea por varios autores (Gerig ⁽⁸⁰⁾, Vaughan ⁽⁸¹⁾ y Zhu ⁽⁸²⁾) que los fenoles y derivados de ácidos benzóico y cinámico son inhibidores del crecimiento de las plantas. En nuestro caso aunque no se identificaron las entidades moleculares responsables de la disminución de la actividad biológica, se consideró que el

valor de pH 3.52 reportado para la fracción F1 (Tabla 5 Anexo 2), es un indicador de la presencia de especies iónicas moleculares de carácter ácido, responsables de la disminución del pH respecto al testigo.

Por otro lado el hecho de que el valor de la conductividad eléctrica de 1699 $\mu\text{S}/\text{cm}$ reportado sea el mayor de todos, corroboró el comportamiento de estas especies.

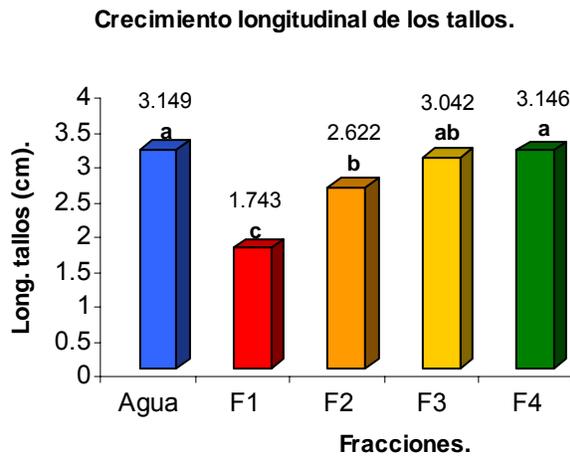


Gráfico 6. Crecimiento longitudinal de los tallos.

3.8. Análisis del peso fresco y seco de semillas germinadas.

La aplicación de las diferentes fracciones mostró incrementos sobre el peso fresco y peso seco de las semillas germinadas con respecto al testigo, siendo significativo para las fracciones F2 y F3 en ambos casos. (Gráficos 7 y 8)

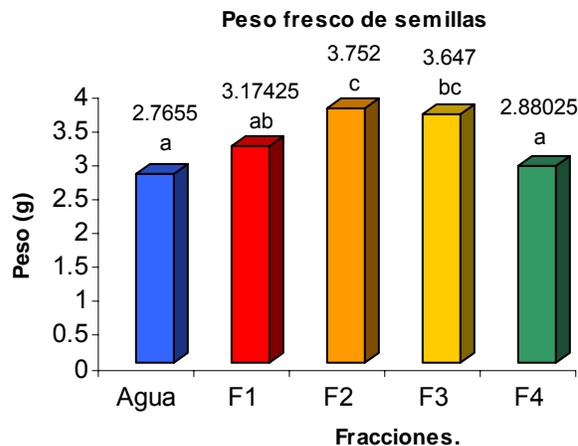


Gráfico 7. Efecto de diferentes fracciones sobre el peso fresco de semillas germinadas

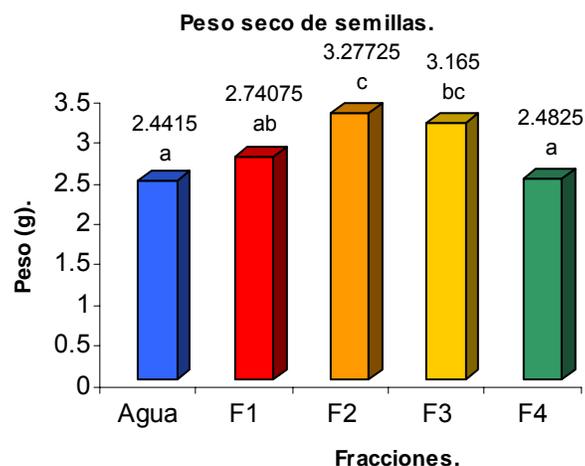


Gráfico 8. Efecto de diferentes fracciones sobre el peso seco de semillas germinadas.

3.9. Análisis de la biomasa.

En el Gráfico 9 se muestra el comportamiento del por ciento de materia seca en raíces. Aquí es necesario destacar que se produjo un efecto inhibitorio del crecimiento radicular descrito anteriormente para las cuatro fracciones utilizadas en el ensayo y que este por ciento de materia seca se correlaciona con este efecto, pues existe una ligera disminución de este índice sin ser significativa. Por otro lado en el Gráfico 10 con respecto al por ciento de materia seca en tallos se aprecia un incremento no significativo.

Del análisis de estos resultados podemos concluir que la presencia de compuestos fenólicos de carácter aromático en las diferentes fracciones, pueden ser los precursores de la formación de especies iónicas reactivas (radicales libres) como el radical 2,6-di-terc-butil-4-amino fenoxilo, molécula presente

durante procesos de estrés y que a su vez este mismo proceso sea el responsable de tal variación, aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de trabajar con plantas en la obtención de metabolitos secundarios con actividad biológica.

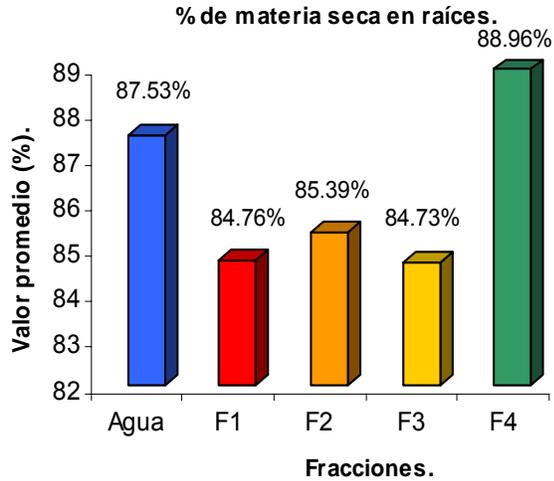


Gráfico 9. % de materia seca en raíces.

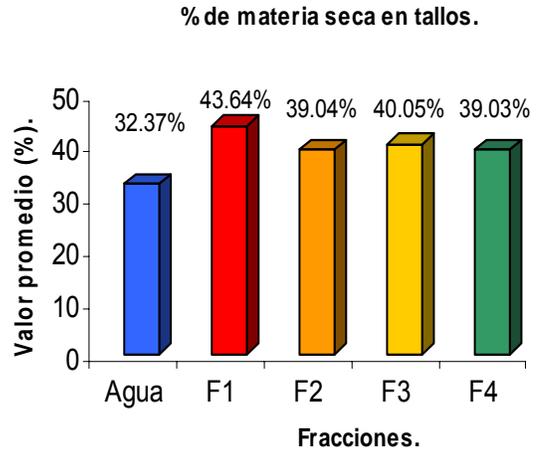


Gráfico 10. % de materia seca en tallos.

1. Se demostró la potencialidad alelopática de diferentes fracciones de orozuz (*Phyla strigulosa*) sobre la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.).
2. Se observó que el uso de diferentes fracciones procedentes del extracto acuoso de orozuz (*Phyla strigulosa*) mostró efectos estimulantes sobre el proceso de germinación en semillas de maíz. (*Zea mays* L.) durante los 7 días del tratamiento.
3. Se expresó un efecto inhibitorio de carácter lineal decreciente del desarrollo del sistema radicular de las semillas germinadas ante la presencia de las diferentes fracciones del extracto acuoso de orozuz, con diferencias significativas respecto al testigo.
4. Se observó una disminución de la elongación de los tallos en las plantas que germinaron en contacto con las diferentes fracciones y marcadamente para la Fracción I.
5. La expresión de los efectos alelopáticos observados nos hace pensar que la acción de las fracciones estudiadas pueden ser asociaciones de algunos tóxicos alelopáticos en orozuz (*Phyla strigulosa*) las cuales pudieran ser analizadas e identificadas.

1. Obtener fracciones enriquecidas en componentes puros y evaluar su actividad biológica a través de bioensayos.
2. Realizar procesos de separación mediante técnicas cromatográficas que nos permitan caracterizar estructuralmente los componentes responsables de la acción alelopática.
3. Evaluar mediante nuevos ensayos biológicos la acción alelopática de las entidades moleculares obtenidas.
4. Incorporar las entidades moleculares obtenidas del extracto acuoso de orozuz (*Phyla strigulosa*) en estudios farmacológicos y toxicológicos preclínicos.

Bibliografía.

1. Méndez, S, I. E. (2003). Verbenaceae. EN: Flora de la Republica de Cuba. Serie A Plantas vasculares. Fascículo 7. Königstein. Germany.
2. Molisch, H. 1937. Der Einfluss eine Pflanze auf die andere :Allelopathie. Gustav Fischer, Jena 106 p.
3. Grümmer, G. 1955. Die gegenseitige Beeinflussung hoherer pflanzen- Allelopathy. Gustav Fischer. Jena. 162pp.
4. Einhelling, F. A. (1995). Allelopathy: Organisms, Process and Applications. American Chemical Society.
5. Muller, W. H. y Muller, C. H. (1964) Bull. Torrey Bot. Club. 91, 327-330.
6. N.A.S
7. Rice, E. L. (1984), Allelopathy, Academic Press, London.
8. Sampietro, D.A. (2001). Alelopatía: Conceptos, Características, Metodología de Estudio e Importancia. <http://w.w.w.faiunne.edu.ar/biologia/alelopatia/alelopatia.htm>
9. Blum, L. and Kogan, M. (1992). Allelopathy in plant. Allelopathy Journal 2 (2): 16-23.
10. Acosta, E. M., Sánchez, B. J., Bañón, A. M. (2001). Auxinas. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de Barcelona. España: 305-323.
11. (Pazmiño, A. (1999). Universidad de Chile, Escuela de Agronomía y Fisiología Vegetal.
"http://www.webcolombia.com/alelopatia.Plantasalelopaticas"
12. Sampietro, D. A. (2003). Definición de Alelopatía.
<http://www.pwp007mundo.com/futuroverde/documento.html>
13. Puente, Mayra. (1998). Efectos alelopáticos del cultivo del Girasol (Helianthus annuus L.) sobre malezas asociadas y cultivos de importancia económica. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV. Santa Clara. Cuba.
14. Anaya Ana Luisa. (1998). La alelopatía: Sutil mecanismo de comunicación química entre organismos. Hoy (23): 61-66.

15. Bowen
16. Lovett, J.V. and Ryuntyu, M.Y. (1992). In "Allelopathy: Basic and Applied Aspects" Edit. By S.J.H. Rizvi and V. Rizvi. Chapman and Hall, London: 11-20.
17. An, M., Pratley, J., Haig, T. (2000). Allelopathy: from concept to reality. <http://me.csu.edu.au/agronomic/papers/314/.Html>
18. Alderéz, O. 1996. Trabajo de diploma. Ingeniero Agrónomo. ISCHH
19. Gliessman, S.R. (1982). Allelopathic interactions in crop/weed mixtures: applications for weed management. Paper presented: North American Symposium on Allelopathic. Nov. 14-17. university of Illinois, Champaign-Urbana.
20. Azcón , Bieto, J., Talón, M. (1993). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Edición Universitat de Barcelona. España
21. Xuan, T.D., Tsuzuki, E., Tawata, S., Khanh, T.D. (2004). Methods to determine allelopathic potencial of crop plants for weed control. *Allelopathy Journal*. 13 (2): 149-164.
22. Blum, U. and Ebercon, A. (1981). Cell membrane stability as a measure of drought and tolerance in wheat. *Crop Science* 21: 43-47.
23. Chowdhury, S.R. and Choudhuri, M.A. (1985). Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiologia Plantarum* 65: 503-507.
24. Czech-Kozłowska, M. and Krzywanski, Z. (1983). Some alternations in membrane properties of red raspberry callus tissue after infection with *Didymella appianata*. *Acta Physiologiae Plantarum* 5: 21-27.
25. Stroinski A. and Floryszak-Wieczorek, J. (1990). Effects of cadmium on the host-pathogen system. III. Influence of cadmium and *Phytophthora infestans* on membrane permeability of potato tuber. *Journal of Plant Physiology*.
26. Politycka, B. (1997). Free and glucosylated phenolics, phenol -glucosyltransferase activity and membrane permeability in cucumber roots as affected by derivatives of cinnamic and benzoic acids. *Acta Physiologiae*

Plantarum 12: 311-317.

27. Politycka, B. and Wojcik-Wojtkowiak, D. (1988). Phytotoxic substances as the cause of the sickness of substrates used for many years in cucumber growing. *Roczniki Akademii Rolniczej, Poznan* 189: 147-157.
28. Besford, R.T., Richardson, C.M., Capel, T. and Tiburcio, A.F. (1993). Effect of polyamine on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 189: 201-206.
29. Borell, A., Carbonell, L., Farras, R., Puig-Parellada, P. and Tiburcio, A.F. (1997). Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiologia Plantarum* 99: 385-390.
30. Floryszak-Wieczorek, J., Grabikowski, E., Kubis, J. and Krzywanski, Z. (1992). The effect of spermidine on lipid peroxidation in oat leaves during water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 14: 3-10.
31. Roberts, D.R., Dumbroff, E.B. and Thompson, J.E. (1986). Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves –a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* 167: 395-401.
32. Aziz, A., Martin-Tanguy, J. and Larber, F. (1998). Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum*. 104: 195-202.
33. Erdei, L., Trivedi, S., Takeda, K. and Matsumoto, H. (1990). Effects of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 137: 165-168.
34. Kubis, J. and Krzywanski, Z. (1989). The dynamics of polyamine accumulation in spring wheat leaves during increasing water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 2: 157-163.
35. Edevra, A.M. and Georgieva, I.D. (1980). Biochemical and histochemical investigations of α - and β - glucosidase activity in an infectious disease, a physiological disorder and in senescence of tobacco leaves. *Physiological Plant Pathology* 17: 237-243.

36. Santa-Cruz, A., Acosta, M., Perez-Alfocea, F. and Bolarin, M. (1997). Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiologia Plantarum* 103: 341-346.
37. Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A. and Bolarin, M.C. (1999). Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 65-71.
38. Shen, H-J., Xie, Y-F. and Lie, R-T. (1994). Effects of acid stress on polyamine levels, ion flux, protective enzymes and macromolecular synthesis in cereal leaves. *Plant Growth Regulation* 14: 1-5.
39. Politycka, B. and Kubis, J. (2000). Changes in free polyamine level and di- and polyamine oxidase activity in cucumber roots under allelochemical stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* 22: 11-16.
40. Angelini, R. and Federico, R. (1989). Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *Journal of Plant Physiology* 135: 212-217.
41. Augeri, M.I., Angelini, R. and Federico, R. (1990). Sub-cellular localization and tissue distribution of polyamine oxidase in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Journal of Plant Physiology* 136: 690-695.
42. Bagni, N. and Pistocchi, R. (1988). Polyamines as growth substances in higher plants. In *Progress in Polyamine Researches* (Eds., V. Zappia and A.E Pegg) p.p 547-558. New York: Plenum.
43. Federico, R., Angelini, R., Cona, A. and Niglio, A. (1992). Polyamine oxidase bound to cell walls from *Zea mays* seedlings. *Phytochemistry* 31: 2955-2957.
44. Goldberg, R. and Perdrizet, E. (1984). Ratio of free and bound polyamines during maturation in mung-bean hypocotyls cells. *Planta* 161: 531-533.
45. Bagni, N. and Pistocchi, R. (1990). Binding, transport and subcellular compartmentation of polyamines in plants. In: *Polyamines and Ethylene Biochemistry, Physiology and Interactions.* (Eds., H.E. Flores, R.N. Artica and J.C. Shanon) pp. 62-72, American Society of Plant

Physiologists.

46. Tretyn, A. (1994). Calcium ions transport through eukaryotic membranes. I. calcium channels. *Postepy Biologii Komorki* 21: 319-340.
47. Glass, A.D.M. and Dunlop, J. (1974). Influence of phenolics upon ion uptake –IV. Depolarization of membrane potentials. *Physiologia Plantarum* 54:855-858.
48. Macri, F., Vianello, A. and Pennazio, S. (1986). Salicylate-collapsed membrane potential in pea stem mitochondria. *Physiologia Plantarum* 67: 136-140.
49. Lieberman, M. (1979). Biosynthesis and action of ethylene. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 533- 591.
50. DiTomaso, J.M., Hart, J.J and Kochian, L.V.(1992). Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiology* 98: 611-620.
51. Appel, H. (1993). Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 12: 1521-1552.
52. Bartoż, G. (1995). *The second face of oxygen*. Warsaw: Państwowe Wydawnictwo Naukowe. 372 pp.
53. Politycka, B. and Wojcik-Wojtkowiak, D. and Pudelski, T. (1984). Phenolic compounds as a cause of phytotoxicity in greenhouse substrates repeatedly used in cucumber growing. *Acta horticulturae* 156: 89-94.
54. Yanagisawa, H., Kato, A., Hoshiai, S., Karniya, A. and Tori, N. (1987). Polyamine oxidase from water hyacinth. Purification and properties. *Plant Physiology* 85: 906-909.
55. Chaudhuri, M.M. and Ghosh, B. (1984). Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryos. *Phytochemistry* 23: 241-243.
56. Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat J.F and Scott, I.M. (1997). Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum* 100: 241-254.
57. Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z. and Ben-Hayyim, G. (1997). *Plant*

- glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* 100: 234-240.
58. Kacperska, A. (1995) the phytohormone involvement in plant responses to environmental stress factors. *Kosmos* 11: 62637.
59. Morgan, P.W. and Drew, M.C. (1997). Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100: 620-630.
60. Yang, S.F. and Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of Plant Physiology* 84: 596-602.
61. Kacperska, A. and Kubacka-Zebalska, M. (1989). Formation of stress ethylene depends both on ACC synthesis and the activity of free radical-generating system. *Physiologia Plantarum* 11: 231-237.
62. Lynch, D.V., Sridhara, S. and Thompson, J.E. (1985). Lipoxygenase-generated hydroperoxides account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes of carnations. *Planta* 161: 121-125.
63. Li, N., Parsons, B., Liu, D. and Matoo, A.K. (1993). Accumulation of wound inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Molecular Biology* 18: 477-487.
64. Politycka, B. and Wojcik-Wojtkowiak, D. (1994a). phenolics compounds in greenhouse substrates growing crops of cucumber. *Buletyn Warzywniczny* 41: 39-48.
65. Dutta, S. and Biggs, R.H. (1991). Regulation of ethylene biosynthesis in citrus leaves infected with *Xanthomonas campestris*_pv. *citri*. *Physiologia Plantarum* 82: 225-230.
66. Hughes, R.K. and Dickerson, A.G. (1989). The effect of ethylene on phenylamine ammonia-lyase (PAL) induction by fungal elicitor in *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 361-378.
67. Hyodo, H. and Yang, S.F. (1991). Ethylene-enhanced synthesis of

- phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. *Plant Physiology* 47: 765-770.
68. Yang, S.F. and Pratt, H.K. (1978). The physiology of ethylene in wounded tissue. In : *Biochemistry of Wounded Plant Tissue* (Ed., G. Kahl). Pp. 595-622. Berlin: de Gruyter.
69. Iiyama, K., Bach-Tuyet Lam, T. and Stone, B.A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* 104: 315-320.
70. Jones, D.H. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry* 23: 1349-1359.
71. Tan, K.S., Hoson, T. and Masuda, Y. (1992). Effect of ferulic and p-coumaric acids on *Oryza* coleoptile growth and the mechanical properties of cell walls. *Journal of Plant Physiology* 140: 460-465.
72. Whitmore, F.W. (1971). Lignin formation in wheat coleoptile cell walls, a possible limitation of cell growth. *Plant physiology* 148: 596-602.
73. Boudet, A-M. (1998). A new view of lignification. *Trends of Plant Science* 3:67-79.
74. Blum, U., Dalton, B.R. and Shann, J.R. (1985a). Effect of various mixtures of ferulic acid and some of its microbial products on cucumber leaf expansion and dry matter in nutrient culture. *Journal of Chemical Ecology* 11: 619-641.
75. Blum, U., Dalton B. R, and Shann, J. R. (1985 b). Effect of ferulic and p-coumaric acids in nutrient culture on leaf cucumber expansions as influenced by pH. *Journal of Chemical Ecology* 11: 1567-1582
76. Einhelling, F.A. (1995). Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: *Allelopathy, . Processes and Applications*. (Eds., Inderjit, K.M.M. Dakshini and F.A. Einhelling). American Chemical Society Symposium Series 582: 96-116, Washington DC: American Chemical Society.
77. Hernández Aro Maikel (2004). Estudio preliminar del potencial alelopático

- del orozuz. (phyla strigulosa var sericea(M. Martens & Galeotti)Moldenke). Tesis de diplomado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV. Santa Clara. Cuba.
78. Aguilar, R. C. (2003). Evaluación del efecto alelopático de Nicotina tabacum L. tesis de maestría. Facultad de Ciencias agropecuarias. UCLV. Santa Clara. Cuba. Pp. 76.
79. Anaya Ana Luisa. (1998). La alelopatía: Sutil mecanismo de comunicación química entre organismos. Hoy (23): 61-66.
80. Gerig, T. M. and Blum, U. (1991). Effects of mixture of four phenolic acid on leaf area expansion of cucumber seedlings grown in Portsmouth B soil materials. Journal of Chemical Ecology 17: 29-40.
81. Vaughan, D. and Ord, B.G. (1991). Extraction of potential allelochemicals and their effects on root morphology and nutrient contents. In: Plant growth and ecological Perspective. (Ed., D. Atkinson). Pp. 399-421, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
82. Zhu, H. and Mallik, A.U. (1994). Interactions between Kalmia and black spruce isolation and identification of allelopathic compounds. Journal of Chemical Ecology 20: 407-421.

TIPO DE EXTRACTO	ENSAYO	METABOLITOS A IDENTIFICAR	APRECIACION	ENSAYO POSITIVO	ENSAYO NEGATIVO
Orgánico Hexano	Dragendorff	Alcaloides	Turbidez definida	+	
	Baljet	Coumarinas	Coloración amarilla	+	
	Sudán III	Ácidos grasos	Manchas rojas en las paredes del tubo de ensayo	+	
	Lieberman n-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	Color verde	+	
	H ₂ SO ₄ (c)	Flavonoides	Coloración carmelita.	+	
	Etanólico	Resinas	Resinas	No produjo nada	
Lieberman n-Burchard		Triterpenos y/o esteroides	Coloración verde oscuro	+	
Espuma		Saponinas	No produjo nada		+
Nihidrina		Aminoácidos libres o aminas en general	No produjo nada	+	
Dragendorff		Alcaloides	Turbidez definida	+	
Baljet		Coumarinas	Coloración amarilla	+	
Kedde		Glicósidos cardiotónicos	Coloración naranja		+
Fehling		Carbohidratos reductores	Precipitado rojo	+	
Cloruro férrico		Fenoles y/o taninos	Color verde intenso (taninos del tipo pirocatecolícos)	+	
Borntrager		Quinonas	Fase superior de color naranja		+
H ₂ SO ₄ (c)		Flavonoides	Coloración	+	

			carmelita		
	Antiocianidinas		Aparición de color amarillo.		+
Acuoso	Espuma	Saponinas	No hubo espuma		+
	Fehling	Carbohidratos reductores	Precipitado rojo	+	
	H ₂ SO ₄ (c)	Flavonoides	Coloración carmelita oscuro		
	Cloruro férrico	Fenoles y/o taninos	Color carmelita-verdoso oscuro		
	Dragendorff	Alcaloides	Precipitado y turbidez	+	
	Principios amargos	Sabor poco dulce			
	Mucílagos		No aparición de consistencia gelatinosa.		+

Tabla 1. Resultados del tamizaje fitoquímico.

# de fracción	pH	Potencial REDOX (mV)	Conductividad	TDS (mg / L)	Salinidad (%)
I	3.74	232	2.37 mS/cm	OFL	1.1
II	4.05	216	77.0 μS/cm	69	0
III	3.96	219	19.6 μS/cm	17	0
IV	3.91	221	17.2 μS/cm	15	0

Tabla 2. Valores de los parámetros químico-físicos medidos para el fraccionamiento I.

# de fracción	pH	Potencial REDOX (mV)	Conductividad	TDS (mg / L)	Salinidad (%)
I	3.24	236	1542 μ S/cm	1477	0.7
II	3.46	244	1392 μ S/cm	1235	0.5
III	4.35	190.8	137.4 μ S/cm	122	0
IV	4.43	181.2	20.5 μ S/cm	18	0

Tabla 3. Valores de los parámetros químico-físicos medidos para el fraccionamiento II.

# de fracción	pH	Potencial REDOX (mV)	Conductividad	TDS (mg / L)	Salinidad (%)
I	3.24	254.0	1628 μ S/cm	1477	0.7
II	4.95	148.4	100.9 μ S/cm	90	0
III	4.52	167.0	18.4 μ S/cm	16	0
IV	4.47	179.5	13.4 μ S/cm	12	0

Tabla 4. Valores de los parámetros químico-físicos medidos para el fraccionamiento III.

# de fracción	pH	Potencial REDOX (mV)	Conductividad	TDS (mg / L)	Salinidad (%)
I	3.52	240	1699 μ S/cm	1512	0.7
II	4.42	181.3	190.8 μ S/cm	170	0
III	4.32	194.7	59.6 μ S/cm	53	0
IV	4.34	184.3	17.6 μ S/cm	16	0

Tabla 5. Valores de los parámetros químico-físicos medidos para las fracciones unidas.

# de muestra	Peso fresco	Peso seco
1	2.9086 g	2.6627
2	2.5661 g	2.3504
3	2.7981 g	2.5642
Promedio	2.7576	2.5257

* Cada muestra se compone de 10 semillas.

Tabla 6. Valores del peso promedio de las semillas antes del experimento.

Tratamiento	Réplicas	1	2	3	4	5	6	7
Agua	1	0	5	10	12	12	12	12
	2	0	2	7	9	9	9	9
	3	0	7	12	13	13	13	13
	4	0	3	8	10	11	11	11
F1	1	0	7	11	12	12	12	12
	2	0	5	12	13	14	14	14
	3	0	6	10	12	13	13	13
	4	0	6	13	14	14	14	14
F2	1	0	5	14	14	14	14	14
	2	0	5	13	14	15	15	15
	3	0	7	14	15	15	15	15
	4	0	11	15	15	15	15	15
F3	1	0	6	15	15	15	15	15
	2	0	4	15	15	15	15	15
	3	0	9	14	14	15	15	15
	4	0	8	12	15	15	15	15
F4	1	0	6	13	15	15	15	15
	2	0	9	13	14	14	14	14
	3	0	9	15	15	15	15	15
	4	0	11	13	13	13	13	13

Tabla 7. Número de semillas germinadas en los 7 días del experimento.

Tratamientos	P.F sem germ	P.S sem germ	% Mat. S	P.F raíces	P.S raíces	% Mat. S	P.F tallos	P.S tallos	% Mat. S	% de germ
	2.848	2.554	89.67	0.231	0.224	96.96	0.52	0.208	40	75%
Agua	2.216	1.991	89.84	0.155	0.137	88.38	0.45	0.156	34.66	
	3.215	2.868	89.2	0.265	0.235	88.67	0.693	0.266	18.43	
	2.783	2.353	84.54	0.201	0.153	76.11	0.486	0.177	36.41	
	2.7655	2.4415	88.31	0.213	0.18725	87.53	0.53725	0.20175	32.37	
	2.504	2.243	89.57	0.177	0.162	91.52	0.381	0.172	45.14	88.30%
F 1	3.58	3.051	85.22	0.224	0.188	83.92	0.287	0.122	42.5	
	3.495	2.964	84.8	0.211	0.168	79.62	0.303	0.13	42.9	
	3.118	2.705	86.75	0.175	0.147	84	0.411	0.181	44.03	
	3.17425	2.74075	86.58	0.19675	0.16625	84.76	0.3455	0.15125	43.64	
	3.5	3.112	88.91	0.197	0.18	91.37	0.531	0.2	37.66	98.30%
F 2	4.029	3.578	88.8	0.204	0.181	88.72	0.505	0.19	37.62	
	3.87	3.327	85.96	0.174	0.143	82.18	0.54	0.203	37.59	
	3.609	3.092	85.67	0.261	0.207	79.31	0.679	0.267	39.32	
	3.752	3.27725	87.33	0.209	0.17775	85.39	0.56375	0.215	38.04	
	3.463	3.033	87.58	0.232	0.201	86.63	0.697	0.303	43.47	100%
F 3	3.66	3.165	86.47	0.251	0.219	87.25	0.744	0.3	40.32	
	3.414	2.877	84.27	0.217	0.176	81.1	0.76	0.287	37.76	
	4.159	3.585	86.19	0.187	0.157	83.95	0.547	0.229	41.86	
	3.674	3.165	86.12	0.22175	0.18825	84.73	0.687	0.27975	40.85	
	3.256	2.882	88.51	0.2	0.186	93	0.531	0.238	44.82	95%
F 4	2.485	2.133	85.83	0.198	0.174	87.87	0.641	0.239	37.28	
	3.134	2.654	84.68	0.221	0.19	85.97	0.729	0.276	37.86	
	2.646	2.261	85.44	0.246	0.219	89.02	0.734	0.289	39.37	
	2.88025	2.4825	86.11	0.21625	0.19225	88.96	0.65875	0.2605	39.83	

Tabla 8. Valores del peso y del % de germinación de los tratamientos.

Tratamiento		Largo raíz R1	Largo tallo R1	Largo raíz R2	Largo tallo R2	Largo raíz R3	Largo tallo R3	Largo raíz R4	Largo tallo R4
Agua	1	9.0	2.2	4.3	3.2	9.1	3.5	1.4	0.5
	2	8.4	1.7	12.5	8	14.2	4.1	11	2.5
	3	6.2	1	7.8	3.5	6.6	2.3	5.5	1.4
	4	10.2	4	8.6	2	10.4	4	7.6	1.8
	5	12.8	5.5	7.5	3	5	2.1	7.6	3.8
	6	6.6	2.4	8	3	13.6	3.6	9.4	3.3
	7	11.3	4.2	6.2	2.2	7	2.3	3.8	3.3
	8	4.6	1.2	7	2.7	9	4	4.5	3.1
	9	9.1	3.5	9	2	8.7	3.8	5.9	5.2
	10	9.7	4.5			7.5	3.9	4	2.7
	11	11.2	3			13.5	3	12.3	4.7
	12	12	4.4			8.8	4.3		
	13					6.3	1.2		
	14								
	15								
F 1	1	3.7	0.8	6.2	1.8	5	2	3.2	1.2
	2	5.3	3	5.8	1.6	2.3	1.8	3.1	0.7
	3	3.5	3.8	3.4	1.6	4.2	1.7	7.4	2
	4	3.8	1.2	7.6	1.4	6	0.5	2.9	1.5
	5	4.5	3.3	9	1.5	7.4	1.5	4.6	3
	6	4.2	0.6	5.6	2	5	1.1	4	2.3
	7	2.8	2.5	3.6	0.4	4.5	1	5.6	3.3
	8	3.4	0.5	4.2	0.3	1.8	0.8	7.5	1.5
	9	5.2	2.6	5.3	2	3.5	1.6	2.5	1
	10	4	3	5.1	2.1	6.5	2	2.5	2.5
	11	3.2	3.1	4.8	0.5	6.2	1.5	7	2.4
	12	2.3	1	6.4	1.1	7	1.7	0.7	2.8
	13			2.5	0.5	6.8	3.6	3.5	1
	14			4	1.6			4.1	2
	15								
F 2	1	3.4	2.6	4.7	0.6	5.5	3	12.5	5.1
	2	8.8	5.8	4.5	2	3.2	3	7.4	3.4
	3	5.1	3.5	11.6	4.5	4.5	2	3.2	2.1
	4	10.1	4.8	8.4	4	2	2	8.3	3.7
	5	4.8	3.1	7.9	4	5	3	3.2	1.5
	6	4.1	1.8	11.1	3.8	2.8	1.8	4.1	1.5
	7	2.3	2.7	8.6	4.1	3.9	2.8	5.7	3.7
	8	2.6	1.4	12.6	4.1	1.5	2	5	3.8

	9	3.6	1.4	8.6	5	2.1	1.5	8.3	3.5
	10	2.5	1.3	4.7	1.7	2.7	3	4.5	3.3
	11	3	2.5	4.8	1.8	4.2	2	6.7	3.5
	12	4.7	1.1	2.3	0.5	5.2	2	7.6	3.4
	13	4	2.3	4	1.6	6.5	3.8	6.4	1.3
	14	3.8	2.6	3.8	0.3	3	1.2	3.2	2.4
	15			4.8	1.9	1	0.6	2.3	2
F 3	1	5.1	3.8	6.7	3.5	6.5	3.1	3.1	0.9
	2	5.5	2.7	8	4	2.4	2.8	4	3.6
	3	5	2.3	9.5	3.5	7.6	5.9	15	3.6
	4	7	3.5	7	5	5.5	4.6	6.1	2.3
	5	6.5	4.4	8	5	4	1.5	5.2	2.5
	6	5.3	2.6	4.3	3.3	2	1.5	7	4.1
	7	6.6	4.2	6.5	4.1	4.8	3.7	0.4	0.4
	8	1.2	2.5	4.5	1.6	2.4	3.2	0.6	0.3
	9	5	1.7	8.2	2.9	5	3.4	4.6	2.1
	10	8.6	5.2	5.7	1.7	5.4	2.6	5.5	1.5
	11	9.3	5	13.6	4.1	4.5	3.1	6.2	5.4
	12	4.8	5.2	4.2	5	4.8	3	8.2	2.8
	13	4.8	2.7	4.5	1	5.7	2.7	4	4.1
	14	2.5	1.2	6.3	2.6	4.0	3.2	6.9	3.8
	15	3.6	0.8	5.8	1.6	1.2	1.5	4.2	2.6
F 4	1	1	1.6	6.4	4.1	4.5	2.6	8	4.1
	2	3	1.8	7.4	4.6	11	4	6.4	4.7
	3	2.7	0.5	4.3	4.8	7	1.7	11	3.2
	4	3	0.3	6.4	3	10.4	3.5	6.3	4.3
	5	5.1	3.2	8.3	0.3	7.5	3.5	9	3
	6	1.1	2	6	2.7	5	2.5	6.8	3.5
	7	2.3	1	3	1.4	5	4.1	6	5.2
	8	4.1	2.1	4	2	11.1	4.1	7.2	2.6
	9	4	2.5	4.1	4	2	3	5.1	3.4
	10	2.7	1.2	9.1	3.5	5.1	3.5	3.8	2.7
	11	10.7	4.5	8.1	4.4	4.1	2.9	8.1	3.5
	12	11	5	4	3.6	8.7	4.2	5	4.2
	13	13.5	4.7	2.6	2.4	10.5	3.8	8.5	4
	14	9.9	3.5	3.2	2.7	10.2	4		
	15	8.2	3.1			0.6	1.9		

Tabla 9. Valores de las longitudes de los tallos y raíces.

Cantidad de semillas germinadas por tratamiento.

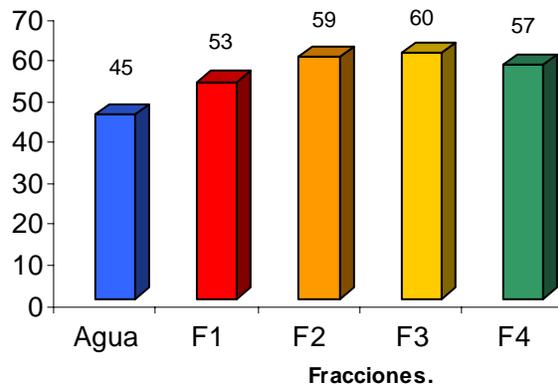


Gráfico 1. Cantidad de semillas germinadas por tratamiento a los 7 días.

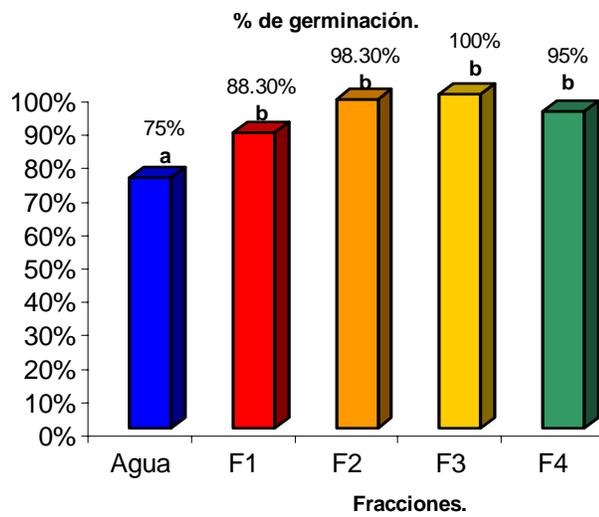


Gráfico 2. % de germinación de las semillas a los 7 días.

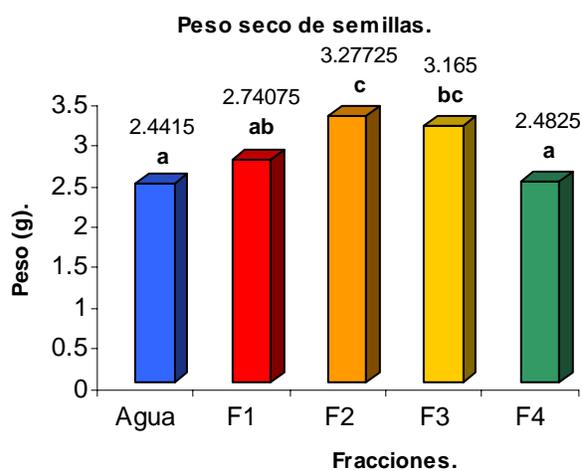


Gráfico 3. Peso seco de semillas germinadas.

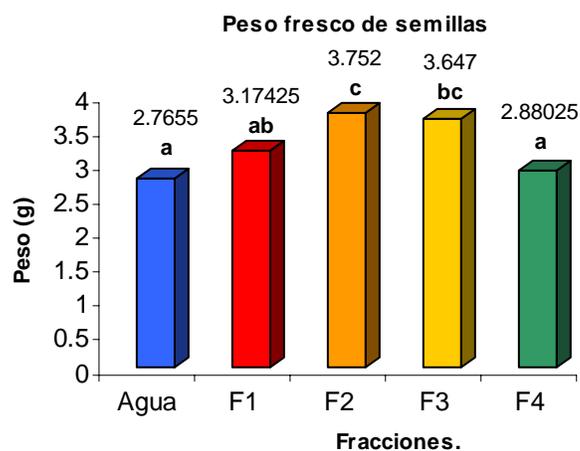


Gráfico 4. Peso fresco de semillas germinadas.

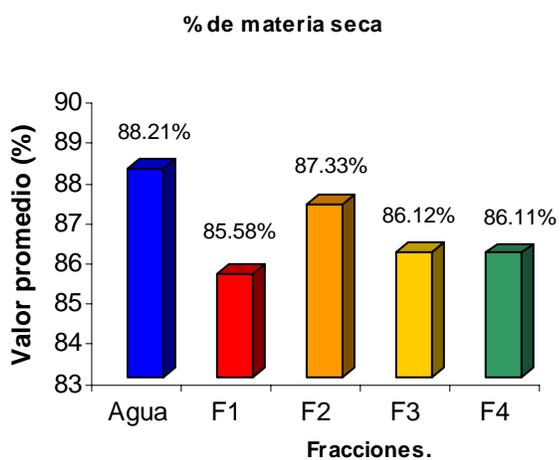


Gráfico 5. % de materia seca de las semillas.

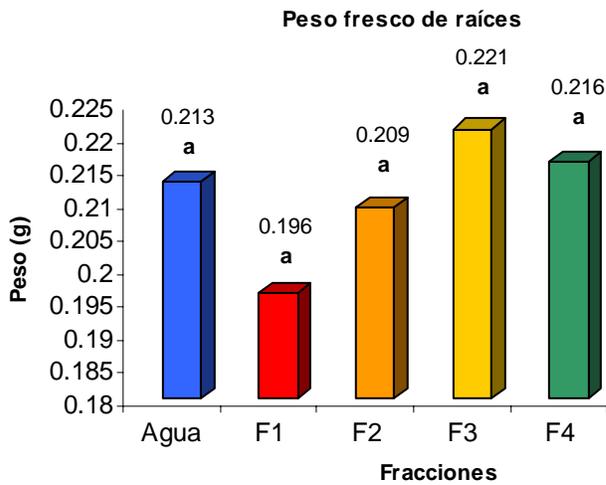


Gráfico 6. Peso fresco de raíces.

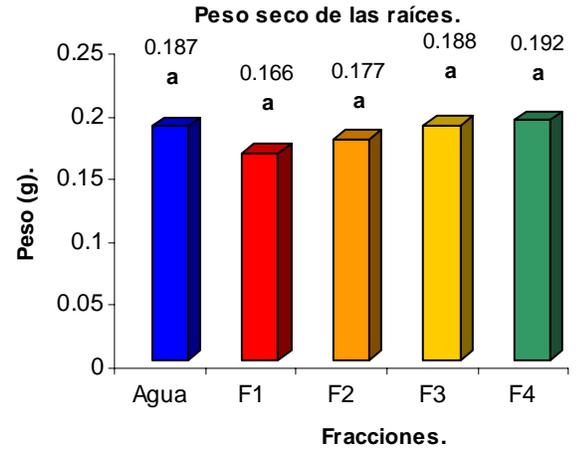


Gráfico 7. Peso seco de las raíces

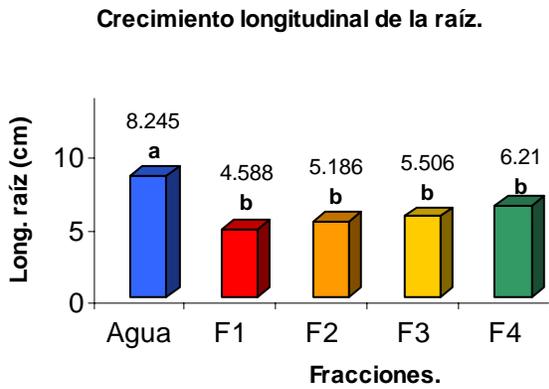


Gráfico 8. Comportamiento del crecimiento longitudinal de la raíz ante la aplicación de las fracciones acuosas de orozuz.

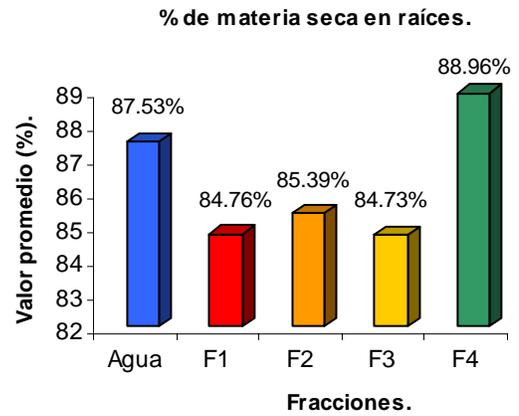


Gráfico 9. % de materia seca en las raíces.

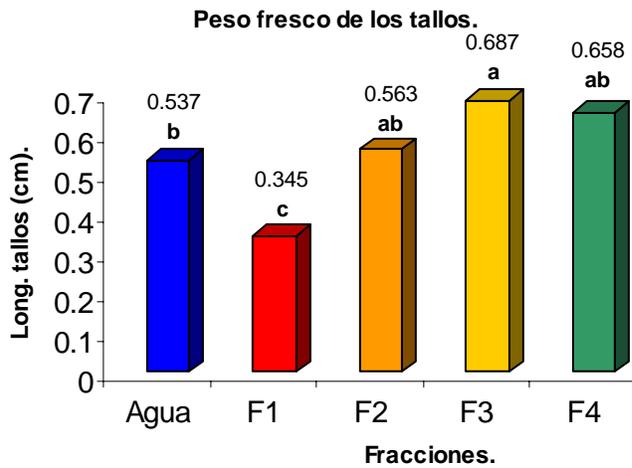


Gráfico 10. Peso fresco de los tallos.

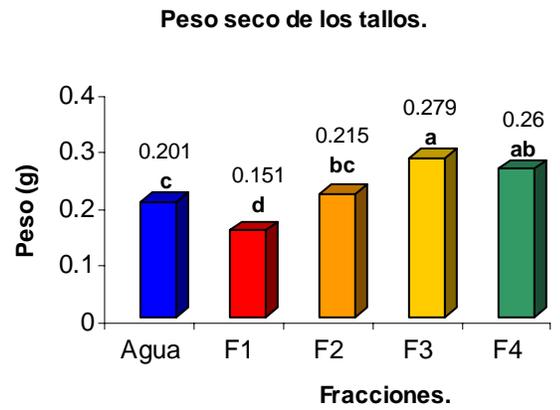


Gráfico 11. Peso seco de los tallos.

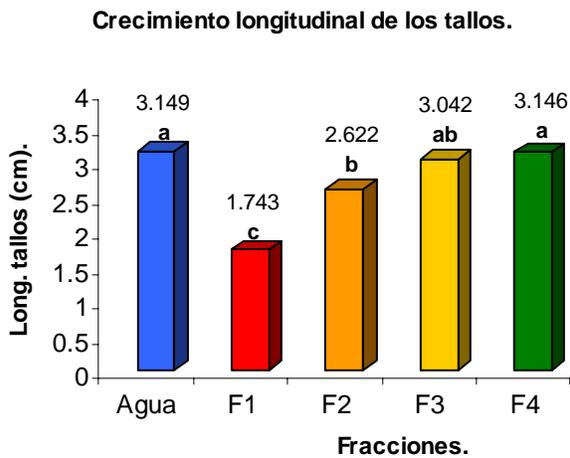


Gráfico 12. Comportamiento del crecimiento longitudinal de los tallos ante la aplicación de las fracciones acuosas de orozuz.

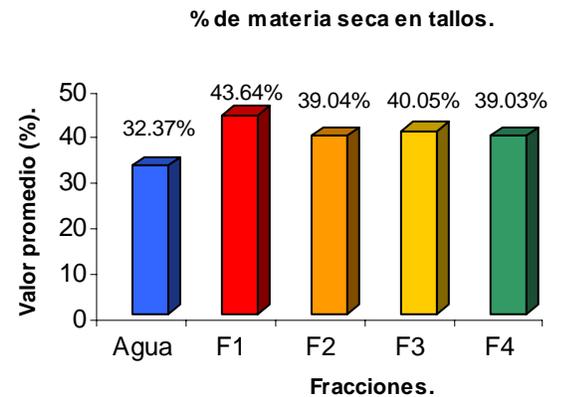


Gráfico 13. % de materia seca de los tallos.

	Control (H ₂ O)	F1	F2	F3	F4
Germinación	75% (b)	88.3% (a)	98.3% (a)	100% (a)	95% (a)
L. raíz (cm)	8.24 (a)	4.58 (b)	5.18 (b)	5.50 (b)	6.21 (b)
L. tallo (cm)	3.15 (a)	1.74 (c)	2.62 (b)	3.04 (ab)	3.15 (a)
P.F.R. (g)	0.213 (a)	0.196 (a)	0.209 (a)	0.221 (a)	0.216 (a)
P.S.R (g)	0.187 (a)	0.166 (a)	0.177 (a)	0.188 (a)	0.192 (a)
P.F.T (g)	0.537 (b)	0.345 (c)	0.563 (ab)	0.687 (a)	0.658 (ab)
P.S.T (g)	0.201 (c)	0.151 (d)	0.215 (bc)	0.279 (a)	0.260 (ab)
P.F.S.G (g)	2.765 (a)	3.1742 (ab)	3.752 (c)	3.674 (bc)	2.88085 (a)
P.S.S.G (g)	2.4415 (a)	2.7407 (ab)	3.2772 (bc)	3.165 (bc)	2.4825 (a)
P.S Planta (g)	0.389 (ab)	0.3175 (b)	0.3927 (ab)	0.468 (a)	0.4527 (a)
% M.S.T	32.37	43.64	39.04	40.05	39.03
% M.S.R	85.53	84.75	85.39	84.73	88.96
pH	4.60	3.52	4.42	4.32	4.34
Potencial REDOX (mV)	174	240	181.3	194.7	184.3
Conductividad	17.64	1699	190.8	59.6	17.6
TDS (mg/L)	16	1512	170	53	16
Salinidad (%)	0	0.7	0	0	0

Tabla 10. Tabla resumen.

Leyenda:

L. raíz: longitud de la raíz.

L. tallo: longitud del tallo.

P.F.R: peso fresco de las raíces.

P.S.R: peso seco de las raíces.

P.F.T: peso fresco de los tallos.

P.S.T: peso seco de los tallos.

P.F.S.G: peso fresco de semillas germinadas.

P.S.S.G: peso seco de semillas germinadas.

P.S Planta: peso seco de la planta.

% M.S.T: % de materia seca en tallos.

% M.S.R: % de materia seca en raíces.

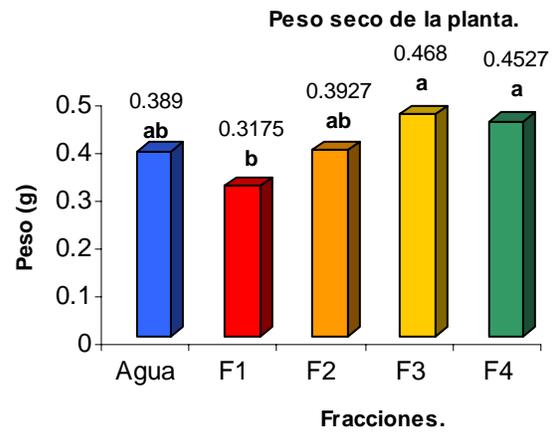


Gráfico 14. Peso fresco de la planta (raíces y tallos)