

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



GRUPO CIENTÍFICO-ESTUDIANTIL DE ALELOPATÍA

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Título: Actividad alelopática de las fracciones del extracto acuoso de (*Ipomoea batatas* (L). Lam.) sobre el crecimiento de algunos cultivos.

Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo.

Diplomante: Amed Pupo Rodríguez

Tutores: Dr. C. Sinesio Torres García

MsC. Rafael Sosa Martínez

“Año 50 de La Revolución”.

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



GRUPO CIENTÍFICO-ESTUDIANTIL DE ALELOPATÍA

Título: Actividad alelopática de las fracciones del extracto acuoso de (*Ipomoea batatas* (L). Lam.) sobre el crecimiento de algunos cultivos.

Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo

Diplomante: Amed Pupo Rodríguez

Tutores: Dr. C. Sinesio Torres García

MsC. Rafael Sosa Martínez

2007 – 2008

"Produce una inmensa tristeza pensar que la naturaleza habla mientras el género humano no escucha."

VICTOR HUGO

A mi madre y mi abuela las cuales son la razón de mí existir.

A mis demás familiares Yamila y sus niños, Robisnier, Melanie, mis tíos.

A ti... que a pesar de estar en el anonimato no quiere decir eso que seas menos importante para mí.

A mi padre. "Ya lo logre".

A mi hermana Laurita.

A Héctor Peña mi hermano del alma.

A mis siempre profesores y también amigos Maykel Hernández, Ángel Mollineda, Ray Espinosa, Maira Puente, Nayibis Del Sol, Mirella que sin el apoyo de ellos este trabajo no existiría.

A Dinora que tantas buenas acciones a tenido conmigo.

A mis tutores Rafael Sosa y Sinesio Torres es de ellos mi trabajo.

A mis amigos Sergio Morales, Leyanis Fiol, Liset Iglesia, Halbert Mendoza, Alexander Jiménez, Julio Cesar Gonzáles, Yoandris Socarras, Keiser Rojas, Raúl Villa, José Luis Gonzáles, Yoanis Gonzáles, Duvier Gil, Eduardo García, Magdiel Morales.

A mis compañeros de aula.

A todos sinceramente gracias...

Resumen

En la investigación se inició el estudio de diferentes fracciones obtenidas por procesos cromatográficos en filtración Gel, ultrafiltración y diluciones del extracto acuoso de (boniato) *Ipomoea batatas* (L) Lam., logrando identificar la presencia cuali-cuantitativa de los compuestos fenólicos y específicamente flavonoides. Los efectos alelopáticos de diferentes fracciones, obtenidas a partir del extracto acuoso de boniato (*I. batatas*), sobre las especies *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol), *Cucumis sativus* L. (Pepino), *Sorghum vulgare* Pers. (Sorgo), fue evaluado empleando técnicas de crecimiento posterior la germinación, en tubos de crecimiento de tejidos. Los diferentes tratamientos (Extracto acuoso 8100; 162 y 1 mg L⁻¹; 150 000; 10 000 y 10 000 Da Np; F1 a F9) fueron administrados en base al valor de los sólidos totales disueltos empleando agua destilada y desionizada como control positivo. A medida que aumentaron las concentraciones aumentó el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hipocótilo y de la radícula de las plantas de *C. sativus*. En plántulas de *P. vulgaris*, las fracciones 4 y 5 estimularon significativamente al hipocótilo. En los tratamientos de ultrafiltración, el corte de 10 000 Da inhibió el alargamiento del hipocótilo, mientras estimuló la radícula, evidenciándose el carácter hormonal del metabolito separado mediante dicho proceso. Debido a la naturaleza de los agentes alelopáticos se pudo apreciar una variabilidad, con marcada estimulación sobre plántulas de *S. vulgare*, en las fracciones 4 y 5, mientras que en la 9 hubo una inhibición significativa, lo que demuestra la viabilidad del proceso de separación por filtración Gel con Sephadex G-10.

Tabla de Contenido.

1. Introducción.	1	▶
2. Revisión Bibliográfica.	3	▶
2.1. Observaciones generales sobre <i>Ipomoea batatas</i> (L) Lam.	3	▶
2.2. Naturaleza química de los compuestos alelopático.	4	▶
2.3. Modo de liberación de los aleloquímicos.	7	▶
2.4. Concentración de aleloquímicos.	9	▶
2.5. Sensibilidad de las especies receptoras.	10	▶
2.6. Mecanismo de acción de los agentes alelopático.	11	▶
2.6.1. Alteraciones hormonales provocadas por agentes alelopáticos.	11	▶
2.6.2. Efectos sobre la actividad enzimática.	11	▶
2.6.3. Efectos sobre la fotosíntesis.	12	▶
2.6.4. Efectos sobre respiración.	12	▶
2.6.5. Efectos sobre procesos asociados a membranas.	12	▶
2.7. Factores que influyen en las relaciones alelopáticas.	13	▶
2.8. Factores que influyen en los resultados experimentales.	14	▶
2.9. Aspectos moleculares relacionados con efectos alelopáticos de compuestos fenólicos.	16	▶
2.9.1 Peroxidación lipídica y cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática.	16	▶
2.9.2. Oxidación de poliaminas.	16	▶
2.9.3. Señales indicadoras.	19	▶
2.9.4. Inducción de fenilamina amonioliasa (PAL) y síntesis de lignina.	20	▶
2.9.5. Inhibición del crecimiento.	21	▶
3. Materiales y Métodos.	24	▶
3.1. Efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso <i>I. batatas</i> sobre el crecimiento de plántulas de Frijol, Pepino y Sorgo en condiciones controladas.	24	▶
3.2. Actividad alelopática de las fracciones de extracto de Boniato sobre el crecimiento de plántulas de Frijol, Pepino y Sorgo en condiciones controladas.	26	▶
3.2.1. Obtención del perfil cromatográfico por la técnica de filtración Gel.	26	▶

3.2.2. Obtención del perfil cromatográfico para el pool ultrafiltrado.	27	▶
3.3. Análisis y caracterización de las fracciones obtenidas del extracto acuoso de <i>I. batatas</i> .	29	▶
4. Resultados y Discusión.	31	▶
4.1. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de plántulas de pepino.	31	▶
4.2. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de plántulas de frijol.	35	▶
4.3. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de plántulas de sorgo.	27	▶
4.4. Caracterización de las fracciones obtenidas por el método filtración Gel.	44	▶
4.5. Caracterización de las fracciones obtenidas por ultrafiltración.		
5. Conclusiones.	44	▶
6. Recomendaciones.	45	▶
7. Bibliografía.		▶

Capítulo 1-Introducción.

Mientras el hombre se dirige hacia su anunciada meta de la conquista de la naturaleza, ha escrito un deprimente inventario de estragos encauzados no sólo contra la tierra que habita, sino contra las vidas que la comparten con él (Carson, 1964).

El modelo actual de agricultura basado en el monocultivo intensivo es insostenible ecológicamente, sanitariamente peligroso y financieramente ruinoso. Este modelo, promovido por la industria petroquímica, se basa en la lucha contra la naturaleza: rompe el equilibrio de los ecosistemas, reduce su diversidad genética natural, necesita cantidades ingentes y crecientes de sustancias químicas, acelera la erosión del suelo y la pérdida de sus minerales, contamina las aguas subterráneas y los ríos, extermina innumerables especies de organismos vivos del suelo vitales para el equilibrio y la salud de las cosechas.

A través de los años se han probado diferentes métodos y estrategias de preparación de suelos, quedando confirmado que no solo el clima impide una producción adecuada de la tierra, sino el manejo inadecuado de los suelos. El uso excesivo de fertilizantes químicos o sintéticos ha traído consigo un significativo trastorno en la microbiota del suelo, además por efecto de acumulación estos pueden provocar la imposibilidad de absorción de nutrientes por las plantas. Por esto, diversos científicos se empeñan en la búsqueda de soluciones alternativas para tal situación (Artieri *et al*, 1997).

El conocimiento de los fenómenos alelopáticos es de gran importancia en los agroecosistemas, pues permite la funcionalidad de numerosas interacciones entre organismos y asegura la supervivencia de muchas especies en su medio. El término alelopatía se define como los efectos beneficiosos o perjudiciales resultado de la acción de compuestos químicos (Aleloquímicos) liberados por una planta (donadora) que ejercen su acción sobre otras plantas (receptoras), además hongos y otros microorganismos a través de exudados de sus órganos (Sampietro, 2001).

Los compuestos alelopáticos (aleloquímicos) suelen ser ácidos fenólicos, terpenos, flavonoides, alcaloides y otros compuestos del metabolismo secundario. La complejidad estructural de estas sustancias es muy variable (desde sencillos como

el ácido fenólico, hasta auténticas exhibiciones de la complejidad). Los compuestos fenólicos presentes en el tejido vegetal regulan los niveles de auxinas, por influencia sobre la oxidasa del IAA y la actividad de esta enzima esta correlacionada negativa o positivamente con el crecimiento de las plantas (Jova, 2006).

El boniato (*Ipomoea batatas*. (L) Lam) o Sweet potato es un cultivo muy común en nuestra región. El mismo tiene una amplia gama de utilidades que van desde el consumo de su tubérculo en la dieta del hombre y alimentación de animales domésticos hasta la producción de medicamentos y harinas industriales. Diversos autores han determinado en sus estudios que el boniato presenta actividad alelopática. Torres *et al.*, (2003) determinaron que el extracto acuoso de boniato estimula el crecimiento de la radícula y el tallo en cultivos como: Melón, (*Cucumis melo* L); Calabaza, (*Cucurbita maxima* Duch.); Maíz, (*Zea mays* L) y Sorgo, (*Sorghum vulgare* Pers.)

Hipótesis:

Si los residuos naturales de Boniato (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) producen estimulación o inhibición del crecimiento de algunos cultivos es porque poseen sustancias aleloquímicas que son las responsables de tales acciones.

Objetivo general:

Probar el efecto alelopático del extracto acuoso extraído del follaje seco de *Ipomoea batatas* (L.) Lam sobre el crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol común), *Cucumis sativus* L. (Pepino), *Sorghum vulgare* Pers. (Sorgo).

Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad alelopática del extracto acuoso de restos de *I. batatas*, en diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de plántulas de Frijol, Pepino y Sorgo en condiciones controladas.
2. Determinar la actividad alelopática de las fracciones del extracto de Boniato sobre el crecimiento de plántulas de Frijol, Pepino y Sorgo en condiciones controladas.
3. Determinar las familias de sustancias químicas implicadas en la actividad biológica manifestada por las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas*.

Capítulo 2- Revisión bibliográfica.

2.1- Observaciones generales sobre *Ipomoea batatas* (L) Lam. (Boniato)

CEMSA 78-354. Ciclo de 120 días, con hojas de borde dentado, las adultas de color verde con manchas moradas en la base y las jóvenes violáceas por ambas caras. El PILP (punto de inserción limbo-pecíolo) es de color morado tanto en las hojas jóvenes como en las adultas. El tallo es grueso de color verde con ligero tinte violáceo en la parte apical. Raíces tuberosas de color crema y carne blanca de forma alargada, posee abundante desarrollo foliar, presenta un promedio de 3,1 raíces tuberosas por planta, es el que mejor se adapta a suelos arenosos, puede plantarse todo el año. Potencial de rendimiento 43 t ha⁻¹.

Denominada camote boniato moniato, (*batata dulce*) en Italia, (*batate*) en Alemania y (*Sweet potato*) en Norteamérica. (Martínez, 1979). Responde a la siguiente clasificación taxonómica.

Reino: *Plantae*, División: *Magnophyllophyta*, Subdivisión: *Magnoliophytina*, Clase: *Magnoliata*, Orden: *Polemoniales*, Familia: *Convolvulaceae*, Género: *Ipomoea*.
Especie: *Ipomoea batatas* (L) Lam.

Entre los cultivos de alimentación del mundo, la batata está en séptimo lugar en producción en peso de acuerdo a documentos recientes de la FAO. En los trópicos, ocupa el cuarto lugar. Diversos atributos de la batata cuentan para su prominencia y reciente resurgimiento del interés en el cultivo. En primer lugar este cultivo soporta condiciones ambientales extremas tales como sequías y vientos huracanados, condiciones que pocos otros cultivos pueden tolerar, cubre rápidamente la superficie reduciendo las necesidades de herbicidas y laboreo cultural, el uso de insecticidas y fungicidas es relativamente bajo, además de que la batata se desarrolla bien con poca suplementación de nitrógeno y en amplio rango de potenciales hidrogénicos de suelo sin la adición de cal (Andrés *et al.*, 2000).

Puerto *et al.*, (2002) determinaron que el extracto acuoso de boniato estimula el crecimiento de la radícula y el tallo en cultivos como: Melón, (*Cucumis melo* L); Calabaza, (*Cucurbita maxima* Duch.); Maíz, (*Zea mays* L) y Sorgo, (*Sorghum vulgare* Pers.).

2.2- Naturaleza química de los compuestos alelopáticos.

Los organismos vegetales están expuestos a factores tanto bióticos como abióticos, con los que han evolucionado. Esto 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. Entre estos encontramos compuestos que provocan diversos efectos sobre otros organismos. En virtud de su estructura, los metabolitos secundarios son químicamente reactivos, es decir, son aptos para ingresar en los sistemas vivos, interactuar y cambiar las estructuras de los receptores o blancos moleculares y penetrar en la célula donde pueden afectar varios procesos fisiológicos (Anaya y Espinosa, 2006).

En dependencia de la especie vegetal se producen diferentes metabolitos secundarios, aunque es frecuente encontrar en una misma planta diversas mezclas de estas sustancias. Estas combinaciones varían en su composición y abundancia en las diversas células, tejidos y órganos de la planta, y se modifican con la edad de las mismas y con las condiciones ambientales (Anaya, 1989 y Olofsdotter, 2001; citado por Gómez *et al*, 2003).

Las estrategias para el descubrimiento de aleloquímicos de plantas, para la determinación del modo de acción de estos compuestos en cultivos se replantean. Las ventajas de estrategias guiadas en ensayo biológico modernas de descubrimiento son provistas. Un acercamiento integral para la determinación de sitio molecular del blanco de aleloquímicos se discute. Finalmente, las estrategias para el realce de producción de aleloquímicos en cultivos por la tecnología del transgén son detalladas (Reigosa *et al*, 2002). La identificación de unos aleloquímicos prepara el camino para fomentar estudios, el cual incluye determinación de su biosíntesis y una manipulación genética eventual de su biosíntesis. Es esto por consiguiente un método apropiado utilizado en su aislamiento del cultivo alelopático. Una variedad de avances puede ser usada en identificar aleloquímicos. (Duke *et al*. 2000).

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. Generalmente los autores la organizan de esta forma:

Compuestos alifáticos: Pocos de estos compuestos son conocidos por su actividad inhibitoria de la germinación de semillas y el crecimiento de plantas. Comprenden varios ácidos por ejemplo; a. oxálico, a. crotónico, a. fórmico, a. butírico, a. acético, a. láctico y a. succínico) y alcoholes (tales como metanol, etanol, n-propanol y butanol) solubles en agua, que son constituyentes comunes presentes en plantas y suelo. Bajo condiciones aeróbicas los ácidos alifáticos son rápidamente metabolizados en el suelo, por lo cual no pueden considerarse una importante fuente de actividad alelopática.

Lactonas no saturadas: La psilotina y psilotinina son producidas por *Psilotum nudum* y *Twesiperis tannensis*, respectivamente. La protoanemonina es producida por varias ranunculáceas. Son poderosos inhibidores de crecimiento aunque el rol de estos compuestos en alelopatía no se conoce completamente.

Lípidos y ácidos grasos: Existen varios ácidos grasos tanto de plantas terrestres como acuáticas que son inhibitorios de crecimiento vegetal. Se pueden citar entre otros los ácidos linoleico, mirístico, palmítico, láurico e hidroxisteárico. Su roll en alelopatía no está completamente investigado.

Terpenoides: Las plantas superiores producen una gran variedad de terpenoides, pero de ellos sólo unos pocos parecen estar involucrados en alelopatía. Frecuentemente estas sustancias se aislaron de plantas que crecen en zonas áridas y semiáridas. Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de los vegetales y son los terpenoides inhibidores de crecimiento más abundantes que han sido identificados en las plantas superiores. Son conocidos por su potencial alelopático contra malezas y plantas de cultivo. Entre los más frecuentes con actividad alelopática se pueden citar el alcanfor, α y β pineno, 1,8-cineol, y dipenteno.

Glicósidos cianogénicos: Entre ellos se encuentran la durrina y amigdalina (o su forma reducida prunasina) de reconocida actividad alelopática. La hidrólisis de estos compuestos da lugar no sólo a cianhídrico sino también a hidroxibenzaldehído que al oxidarse origina el ácido p-hidroxibenzoico, el cual posee por sí mismo actividad

alelopática. La durrina es frecuente entre especies tanto cultivadas como silvestres del género *Sorghum*. La mayoría de los miembros de la familia *Brassicaceae* producen grandes cantidades de estos glicósidos, los que por hidrólisis producen isotiocianato con igual actividad biológica (Swain *et al.*, 1992).

Compuestos aromáticos: Estos comprenden la mas extensa cantidad de agentes alelopáticos. Incluye fenoles, derivados del ácido benzoico, y del ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos.

Fenoles simples: Entre ellos las hidroxiquinonas y la arbutina, se aislaron de lixiviados de *Arctostaphylos* e inhiben el crecimiento de varias plantas.

Ácido benzoico y derivado: Derivados del ácido benzoico tales como los ácidos hidroxibenzoico y vainílico, están comúnmente involucrados en fenómenos alelopáticos. Dentro de las especies que los contienen se pueden citar el pepino, la avena (*Avena sativa* L.) y el sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.)

Acido cinámico y sus derivados: La mayoría de estos compuestos son derivados de la ruta metabólica del ácido shikímico y están ampliamente distribuidos en las plantas. Se identificó la presencia de los mismos en pepino, girasol (*Helianthus annuus* L.) y guayule (*Parthenium argentatum*). Otros derivados de los ácidos cinámicos tales como clorogénico, cafeico, p-cumárico, y ferúlico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son inhibitorios de una gran variedad de cultivos y malezas. Los efectos tóxicos de estos compuestos son pronunciados debido a su larga persistencia en el suelo y muchos derivados del ácido cinámico han sido identificados como inhibidores de la germinación.

Quinonas y derivados: varias de las quinonas y sus derivados provienen de la ruta metabólica del ácido shikímico. El ejemplo clásico de estos compuestos es la Juglona y naftoquinonas relacionadas.

Cumarinas: Las cumarinas están presentes en muchas plantas. La metil esculina fue identificada en *Ruta*, *Avena* e *Imperata*. Compuestos tales como escopolina, escopoletina y furanocumarinas tienen capacidad inhibitoria del crecimiento vegetal (Osorio, 2006).

Flavonoides: Una amplia variedad de flavonoides tales como floridzina (producida por *Malus* y algunas ericáceas) y sus productos de degradación tales como glicósidos de quempferol, quercetina y myrcetina son agentes alelopáticos bien conocidos.

Taninos: Los taninos, tanto los hidrolizables como los condensados, tienen efectos inhibitorios debido a su capacidad para unirse a proteínas (Hernández *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2004; Carson, 2007).

Taninos hidrolizables comunes tales como los ácidos gálico, elágico, trigálico, tetragálico y quebúlico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La mayoría están presentes en suelos de bosques en concentraciones suficientes para inhibir nitrificación. Los taninos condensados, los cuales se originan de la polimerización oxidativa de las catequinas, inhiben las bacterias nitrificantes en suelos forestales y reducen el ritmo de descomposición de la materia orgánica el cual es importante para los ciclos de circulación de minerales en el suelo. Los mecanismos de acción de estos compuestos están relacionados con la oxidación de enzimas, la posible reacción con los grupos – SH (sulfidrilico) e inactivación de proteínas a nivel de membrana, propiedad llamada astringencia (González *et al.*, 2001; Rukhsan *et al.*, 2005; Geron, 2007).

Alcaloides: Pocos alcaloides se conocen con actividad alelopática. Algunos como la cocaína, cafeína, cinchonina, fisostigmina, quinina, cinconidina, estriquina son reconocidos inhibidores de la germinación. La cebada exuda por sus raíces la gramina que inhibe el crecimiento de *Stellaria media*. La cafeína mata ciertas hierbas sin afectar algunas especies cultivadas (Sampietro 2002).

2.3. Modo de liberación de los aleloquímicos.

Según Rice (1984); Harborne (1999); Narwal (1999) comentan que los aleloquímicos pueden ser liberados al ambiente por difusión a través de las membranas, por exudación activa de los tricomas glandulares que son estructuras especializadas ubicadas en las hojas o bien por degradación de tejidos muertos. La forma de liberación depende de la estructura química del compuesto; puede ocurrir por volatilización, lixiviación o sea lavado, exudación de raíces y descomposición de restos vegetales.

Lixiviación: Es la remoción de sustancias presentes en las plantas por efecto de la lluvia, nieve, niebla o rocío. El grado de lixiabilidad depende del tipo de tejido vegetal, la edad de la planta y la cantidad y naturaleza de la precipitación. De esta manera se liberan una gran variedad de agentes alelopáticos de diferente naturaleza tales como compuestos fenólicos, terpenos y hojas sobre plantas silvestres y cultivadas.

Volatilización: La liberación de agentes alelopáticos por volatilización está frecuentemente confinada a plantas que producen terpenoides. Los géneros que comúnmente liberan compuestos volátiles incluyen *Artemisia ssp*, *Salvia ssp*, *Parthenium ssp*, *Eucalyptus ssp*. y *Brassica ssp*. Estas sustancias han demostrado también actividad insecticida y como disuasivos alimenticios. La toxicidad de los compuestos volátiles es prolongada, debido a su adsorción a las partículas del suelo, lo cual les permite permanecer varios meses en él. En ecosistemas de desierto y mediterráneos, la liberación de compuestos alelopáticos a través de volatilización es frecuentemente observada, debido al predominio de altas temperaturas, e influencia la distribución de las especies vegetales. Ejemplo de esto se observa en la germinación de semilla de pepino al aplicarle aceite esencial de *Minthostachys mollis* se presenta un efecto volátil, debido a la composición química de aceite esencial de la misma, la cual produce efectos inhibitorio en la germinación y elongación de radícula en pepino.

Alonso *et al*, 2006, plantea que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* presenta efecto volátiles sobre la germinación de semilla de pepino, debido a la composición química de aceite esencial de la misma, la cual produce efectos inhibitorio en la germinación y elongación de radícula en pepino.

Exudados radicales: La reducción en rendimiento observada en algunos cultivos en varios casos se ha atribuido a toxinas liberadas por otros y malezas adyacentes. Los exudados radiculares comprenden únicamente entre el 2-12% del total de fotosintatos de la planta. La gran parte de los agentes alelopáticos conocidos son exudados radiculares. Factores tales como la edad del vegetal, nutrición, luz y humedad influyen cualitativa y cuantitativamente la liberación de sustancias por

las raíces. Además que exudados de raíces de *Lantana camara* inhibieron la germinación, el peso de plántulas y de raíces se soya, rábano, tomate y quimbombó (Ambika *et al*, 2003).

Descomposición de residuos vegetales: Los residuos en descomposición de la planta liberan una gran cantidad de agentes alelopáticos. Los factores que influyen este proceso incluyen la naturaleza del residuo, el tipo de suelo, y las condiciones de descomposición. Eventualmente las sustancias alelopáticas liberadas por los residuos vegetales en el suelo entran en contacto con las raíces de plantas presentes en el mismo ejerciendo su acción. Los compuestos liberados por la planta al suelo sufren frecuentemente transformaciones realizadas por la microflora del mismo, que pueden originar productos con actividad biológica mayor que sus precursores. Investigaciones utilizando extractos acuosos vegetales han demostrado que los inhibidores solubles en agua presentes en la planta de cultivo pueden ser rápidamente liberados durante el proceso de descomposición.

2.4. Concentración de aleloquímicos.

No todas las sustancias liberadas por las plantas son inhibidoras por el contrario algunas manifiestan efectos estimulantes, mas aun ciertos metabolitos pueden provocar reacciones de estimulo o de inhibición dependiendo de su concentración. Por ello cualquier clasificación de los productos tóxicos como las plantas que la generan resultarían arbitraria así la tototoxicidad no solo depende de las sustancia en si sino que también de la concentración en las mismas en el sitio de acción y de al especie sobre la cual se ejerce (Kogan, 1992). En diferentes especies de plantas se producen diferentes metabolitos secundarios, aunque es frecuente encontrar en una misma planta diversas mezclas de estas sustancias. Estas combinaciones varían en su composición y abundancia en las diversas células, tejidos y órganos de la planta, y se modifican con la edad de los mismos y con las condiciones ambientales (Anaya, 1989; Olofsdotter, 2001). Citado por (Gómez *et al.*, 2003).

Por otra parte Gonçalves *et al.*, (2001), al probar extractos de la maleza *Rottboelia cohinchinensis* (Lour.) Clayton (*Poaceae*) sobre la cebolla encontró que los

extractos de raíces no afectaron la germinación de la cebolla, mientras los de follaje la estimularon en todas las concentraciones ($0.1-1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Los extractos de raíces inhibieron la radícula en todas las concentraciones y el follaje solo inhibió a concentraciones por encima de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Los extractos de radícula y follaje inhibieron el crecimiento del tallo en todas las concentraciones. Esto evidencia la influencia de los órganos y también la sensibilidad de estos en el efecto alelopático. Esta misma evidencia se pudo constatar por Dos Santos *et al.* (2001) al probar extractos de *Thelypteris scabra* Presl. sobre lechuga y cebolla. Una inhibición de la germinación de la cebolla se percibió bajo todos los niveles aplicados, mientras no hubo afectación en el caso de la lechuga. En cambio a la concentración de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ los lixiviados inhibieron en un 14.7% la elongación radicular de la lechuga y en un 28.1% a la cebolla, no observándose afectación del crecimiento caulinar a por debajo de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La estimulación a bajas concentraciones, así como la inhibición a más altas concentraciones es un fenómeno ampliamente observado en respuesta a los aleloquímicos liberados por las plantas, desde los niveles morfológicos hasta los bioquímicos (Calabrese y Baldwin, 2003).

2.5. Sensibilidad de las especies receptoras

Es importante acotar también que la sensibilidad diferencial (inhibición o estimulación) entre dos especies receptoras puede deberse fundamentalmente a dos cuestiones importantes en el fenómenos alelopático, a las altas concentraciones de los aleloquímicos en los tejidos secos de la planta donadora o a la mayor sensibilidad de la especie receptora a los aleloquímicos presentes en la especie donadora (Nava *et al.*, 2005).

An (2005), comenta que el fenómeno alelopático depende del aleloquímico en específico, de las características genéticas del organismo donador y la fase de desarrollo en que se encuentre, de las condiciones ambientales en que los aleloquímicos son producidos y liberados, así como de la sensibilidad dado el genotipo de la especie receptora que se trate. Ejemplo de esto se observa en los

estudios de laboratorio realizado por (Ambika *et al.*, 2003), ha revelado el efecto alelopático de estas especies, inhibiendo diferentes partes o promoviendo el crecimiento de plantas como pepino, maíz, etc. Sin embargo se aclaran que el grado de inhibición o estimulación depende de la concentración empleada y de la especie blanco.

2.6. Mecanismo de acción de los agentes alelopático.

Según Blum and Kogan (1992), existen dos formas fundamentales de acción de los aleloquímicos sobre plantas receptoras; directa e indirecta. Existen dos formas fundamentales de acción de los aleloquímicos sobre las plantas receptoras, directa e indirecta. 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:

2.6.1 Alteraciones hormonales provocadas por agentes alelopáticos.

Los compuestos fenólicos pueden reducir o incrementar la concentración de Acido Indol Acético (AIA), una fitohormona del grupo de las auxinas. Otros compuestos fenólicos inhiben la acción de otra fitohormonas, la giberelina y el ácido abscísico (ABA), es una hormona vegetal cuyo incremento en la planta está asociado a una concentración de stress fisiológico. Por todo lo anterior se presupone que en gran parte de los casos la actividad alelopática producida por estos ácidos es debido a la interferencia que provocan en la actividad normal de las auxinas.

2.6.2 Efectos 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 sobre la regulación de la actividad

enzimática. Por ejemplo, plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico mostraron un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasa y ácido indol acético oxidasa) junto con una elevación de enzimas de la ruta del ácido shikímico tales como fenil alanina amonio liasa y la cinamil alcohol deshidrogenasa involucrada en la síntesis de compuestos fenilpropanoides.

2.6.3. Efectos sobre la fotosíntesis.

En los experimentos realizado con plantas enteras, suspensiones de células y cloroplastos para averiguar si los agentes alelopáticos eran capaces de inhibir el proceso fotosintético. Es necesario aclarar que el efecto inhibitorio del agente alelopático sobre la fotosíntesis no necesariamente acontece en los eventos primarios del proceso, sino como resultado de una modificación en los niveles de clorofila o por cierre de los estomas y la subsecuente reducción en la provisión de CO₂ vital para la producción de fotosintatos. Ciertos flavonoides parecen interferir en la organización funcional o estructural del cloroplasto. El quemperol, por ejemplo, aparentemente actúa como un inhibidor de transferencia de energía, impidiendo la síntesis de ATP.

2.6.4. Efectos sobre respiración.

Los efectos de los aleloquímicos sobre la respiración, se ensayan normalmente los mismos sobres suspensiones mitocondiales. Dentro de los compuestos fenólicos el orden de mayor a menor actividad es quinonas > flavonoides > cumarinas > ácidos fenólicos. Las p-benzoquinonas (sorgoleone y juglona) son efectivos inhibidores a muy baja concentración. Nuevamente el sorgoleone afecta el transporte de electrones, mientras que la juglona afecta la incorporación mitocondrial de oxígeno. Dado así flavonoides tales como la quercetina, naringenina y umbeliferona inhiben la producción de ATP en la mitocondria.

2.6.5. Efectos 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, provocando

alteraciones en la estructura y permeabilidad de las mismas. Los efectos aditivos son conocidos por la incorporación de minerales. Ejemplo de esto se observa en plantas de pepino (*C. sativus*) cuando hay presencia de incorporación de fósforo al mezclarse los ácidos ferúlico, vainílico y p-cumárico. Los ácidos fenólicos y las cumarinas alelopáticas también provocan alteraciones en el contenido de agua en la planta. Por ejemplo, el ácido ferúlico reduce la incorporación de agua por las raíces. Paralelamente, eleva los niveles endógenos de ABA.

2.7. Factores que influyen en las relaciones alelopáticas.

La actividad alelopática depende de diversos factores, como son:

- Factores abióticos (radiación UV, temperatura, precipitaciones, pH de suelo). Blum and Kogan (1992), citado por (Pazmiño 1999).
- Sensibilidad de la especie receptora.
- La naturaleza química de las sustancias alelopáticas
- El modo de liberación de los aleloquímicos al medio.
- Actividad de los microorganismos del suelo.
- Concentración de los aleloquímicos en el medio

Pazmiño (1999), menciona que es necesario establecer cuatro condiciones para que una interacción pueda considerarse como alelopatía, una demostrar la existencia de interferencias, describir los síntomas y cuantificar el grado de interferencia, aislando, ensayando y caracterizando los aleloquímicos. Por otra parte los síntomas de interferencia previamente diagnosticados, deben ser repetidos por la aplicación de toxinas a dosis presentes en la naturaleza. Y por ultimo la liberación de las toxinas, su movimiento y captación por parte de la planta receptora debe ser monitoriada y demostrar que las dosis es suficiente para explicar la interferencia observada.

Otros factores que afectan a la alelopatía son: Los cambios en la composición de las plantas, otra fuente de interferencia de las plantas con el crecimiento y

rendimiento de otras plantas y las herramientas en la reducción de pérdidas en los cultivos frente a la invasión de otras especies. Aldrich (1984) citado por Puente (1998).

Bower (1991) citado por Puente (1998) señala como para se produzca estos efectos 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 son conocidas por ser 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. Lovetl (1989) citado por An *et al.*, (2000).

No obstante para que todo fenómeno alelopático, de cualquier naturaleza, ejerza su efecto como tal, debe cumplir las siguientes condiciones: (Alderéz, 1996 citado por Puente 1998).

1. Que exista en el suelo suficiente cantidad o concentración del compuesto alelopático.
2. Que el aleloquímico debe entrar en contacto directo o interactuar de alguna forma con una planta susceptible.

2.8. Factores que influyen en los resultados experimentales.

La utilización de los bioensayos en semillas y plantas como modelos experimentales ha sido una de las principales vías mediante la cual se contribuye a los actuales conocimientos de los fenómenos alelopáticos. La investigación en condiciones de laboratorio permite conocer y avanzar en cuanto a las tecnologías para la producción y el mantenimiento de nuevos compuestos moleculares con actividad alelopática necesarias para estudios posteriores. Las mejoras en las instalaciones y manipulación de los modelos biológicos y sustancias permiten disminuir la incidencia de contaminación durante los ensayos. Cada vez es más importante la influencia que los factores ambientales sobre la experimentación y por tanto se hace necesario la realización de experimentos en condiciones y

variables definidas para asegurar una correcta correlación entre los resultados obtenidos a nivel de laboratorios y/o condiciones de campo (Morgan, 1978).

Mientras los bioensayos a nivel de laboratorio sirven como herramienta importante en el descubrimiento de la actividad alelopática en particular, los estudios de campo tienen como finalidad, comprobar si la actividad biológica de los diferentes componentes de un extracto vegetal determinado bajo condiciones controladas se comporta como unidad bajo la influencia de factores tanto bióticos como abióticos.

El suelo es un sistema dinámico, donde la actividad biológica de las sustancias depositadas puede ser transitoria y su disponibilidad verse afectada por factores tales como disminución de la velocidad de difusión, sorción de los agentes aleloquímicos por las partículas de suelo, interacciones con materia orgánica, microorganismos, efectos enzimáticos derivadas de microorganismos.

An (2005), pensó conceptualmente en las herramientas fundamentales necesarias que en condiciones de campo permitan formular un modelo que pueda describir el comportamiento esperado del sistema bajo condiciones definidas e identificar y modelar las fuentes de variabilidad propias del proceso de interacción alelopática y variabilidad atribuible al medio ambiente. Por tanto es necesario proponer una designación específica basada en la interacción entre planta donadora y receptora tomando en cuenta (a) liberación de los agentes con actividad biológica desde la radícula al medio ambiente (suelo), (b) transporte de los agentes con actividad biológica desde la planta donador hasta la radícula de la planta hospedera donde se encuentran los target moleculares, (c) Exposición de los target moleculares en la planta hospedera. Sin embargo, es necesario considerar que aunque los procesos a y b necesitan ser estudiados, el modelo debe hacer énfasis en (b) donde se encuentra involucrado la presencia del aleloquímico en el suelo y su transporte hasta los target en la planta hospedera. En este sentido, también son considerados la naturaleza de las interacciones entre los procesos de retención, transformación, transporte y la influencia de la especie química, suelo, clima y factores tanto bióticos como abióticos.

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

2.9.1 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. 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. Los efectos sobre la permeabilidad de la membrana plasmática de los derivados del ácido cinámico (ácido telúrico y p-cumárico) 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 (Política y Wojcik-Wojtkowiak, 1988).

2.9.2. 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 (Blum and Ebercon, 1981; Czech -Kozłowska y Krzywanski1983; Chowdhury y Choudhuri, 1985; Stroinski y Floryszak-Wieczorek 1990). 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 (Erdei *et al.*, 1990; Aziz *et al.*, 1998; Santa-Cruz *et al.*, 1999).

En estudios realizados sobre la raíz de pepino solamente fueron detectados: la putrescina y espermidina (Política y Kubis, 2000). 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 (Angelini y Federico, 1989; Federico *et al.*, 1992).

La putrescina ha sido transportada por el apoplasto por oxidación enzimática, la posibilidad de tal transporte es analizado por Bagni y Pistocchi (1988), 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 (Tretyn, 1994). Tales cambios en los potenciales eléctricos de la membrana plasmática, también fueron observados bajo la influencia de ácidos fenólicos. En otro sentido Lieberman (1979) encontró Ca^{2+} acumulado en células de raíces para el caso de guisantes, bajo el efecto de ácido cumárico, p-hidroxibenzóico y vanílico 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 plasmalema, 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 *et al.*, (1992) quien encontró que los niveles de putrescina en la raíz de cultivos de maíz, fue transportada del citoplasto 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. (Política y Wojcik-Wojtkowiak, 1988).

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 (1993), 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 (1995) 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 *et al.*, (1984) 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, 1993).

2.9.3. 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 *et al.*, (1997), 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 plantean 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 *et al.*, (1997) lidera 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 (Kacperska, 1995). En estudios sobre la influencia del etileno y el stress en plantas 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 danos 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 (Kacperska, 1995). Según Lynch y Thompson (1985), 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 (Li *et al.*, 1993). También Yang y Hoffman (1984) 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).

2.9.4. 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 (Política y Wojcik-Wojtkowiak 1994a).

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 (Dutta y Biggs, 1991; Hyodo y Yang, 1991).

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-cumárico sobre la actividad PAL y síntesis de lignina, estos resultados también evidencian una participación de la influencia del ácido p-cumárico 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 (Tan *et al.*, 1992).

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 (Boudet, 1998).

2.9.5. Inhibición del crecimiento.

La aplicación de ácido felúrico y p-cumárico en la raíz de pepino, origina incrementos tanto de la actividad PAL y el contenido de lignina, pero inhiben el crecimiento (Li *et al.*, 1993). Mientras que la aplicación de ácido p-hidroxibenzóico y vanílico 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-cumárico 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. Las macromoléculas de lignina son originadas a partir del alcohol cinámico y los últimos estadios de lignificación son iniciados por la enzima peroxidasafenoxil radical dependiente. A pesar de que la procedencia del peróxido de hidrógeno durante la reacción de oxidación del fenol por peroxidasas 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- cumárico incrementan la actividad de peroxidasa NADH dependiente comparado con la influencia de los ácidos p-hidroxibenzóico y vanílico.

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-cumárico mientras que en raíces tratadas con ácido benzóico y vanílico se produjeron insignificantes incrementos en la actividad de la enzima estudiada (Política y Wojcik-Wojtkowiak, 1988).

Similares resultados fueron observados para peroxidasas procedentes de tejido de tabaco, las cuales despliegan una alta afinidad por los ácidos fenólico y p-cumárico y no por los ácidos p-hidroxibenzóico y vanílico. 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.

Capítulo 3- Materiales y Métodos.

Nuestro trabajo se realizó en La Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. (UCLV), en el laboratorio de alelopatía del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), en el período comprendido entre diciembre de 2007 y mayo de 2008.

3.1. Efecto de diferentes concentraciones de extracto acuoso *I. batatas* sobre el crecimiento de plántulas de Frijol, Pepino y Sorgo en condiciones controladas.

El material vegetal fue colectado en el Jardín de Variedades perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), en el municipio de Santo Domingo, provincia de Villa Clara. Se colectaron hoja, tallo y flor de *I. batatas*, var. CEMSA 78-354 en el período de cosecha.

El material vegetal una vez troceado se introdujo en una estufa (memmert modell 100) a 45⁰C por un período de 72 horas.

El molinado del material seco se realizó en un molino de martillo marca VEB NOSSER 8225 NOSSEN con un tamiz acoplado de 0.5 mm de diámetro.

La maceración se realizó con una proporción de 1/10 (p/v) utilizando agua destilada y desionizada (Tabla 1).

Tabla 1: Características físico-químicas del agua destilada y desionizada.

	pH	Cond (mS cm⁻¹)	Sald.	TDS (mg L⁻¹)	Temp. (°C)
H₂O Destilada y Desionizada	6.9	5,88	3.1	3.0	26.1

Colocándolo en una zaranda (*Heidolph UNIMAX 1010*) a 115 rpm durante 24 horas.

La filtración se realizó con papel del filtro Watman 40 colocado en un quitazato acoplado a una bomba de vacío. El extracto acuoso (Pool) obtenido fue sometido a centrifugación con una centrifuga MiniSpin a 13000 rpm por 10 min. Al mismo se

le realizaron análisis químico-físico con el pH/conductímetro Inolab Level 1. (Tabla 2).

A partir del pool inicial se realizaron 3 diluciones en base al Total de Sólidos Solubles (Tabla 2).

El diseño del experimento fue al azar completamente aleatorio. Después de logrado el 50% de germinación en las semillas de los cultivos a tratar se procedió al transplante de las mismas hacia tubos de crecimiento de tejido con un diámetro de 1.5 cm y 15 cm de altura cada uno con un disco de papel de filtro en su interior para la retención de extracto acuoso y/o sus diluciones y fracciones, con una plántula por tubo y se aplicaron 200 μl del tratamiento correspondiente y posteriormente se le aplicó 50 μl cada 24 h. Cada plántula se tomó como una réplica y se utilizaron 10 por cada tratamiento. Las variables medidas fueron: largo del hipocótilo (LH), largo de la radícula (LR), número de raíces (NR), peso fresco (PF), peso seco (PS). Los tratamientos para su aplicación se sub dividieron en tres categorías para facilitar el procesado de la información Diluciones:

- Extracto acuoso (8100 mg L^{-1}), extracto acuoso diluido 162 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} y $10^{-30} \text{ mg L}^{-1}$.
- Fracciones obtenidas mediante filtración Gel (9 fracciones)
- Ultrafiltración con las fracciones no convencionales 10 000, 150 000 Da y 10 000 Da Np (no permeado o de rechazo).

El tiempo de realización 6 días, exposición luz/oscuridad 12 h en cámara de flujo laminar con luz fluorescente de intensidad luminosa 564,4 Lux. Los datos fueron procesados con paquete estadístico Statgraphics 5.0 y SPSS 8.0 para Windows. Se aplicó análisis de varianza simple, pruebas de Duncan, Tukey y Dunnett c según correspondieron.

Las semillas de las especies de blanco se obtuvieron de la Empresa de Semillas del municipio de Santa Clara.

- **Pepino var. Hatuey-1.**



- **Sorgo var. CIAP 132R.**



- **Frijol var. ICA-Pijao.**



3.2. Actividad alelopática de las fracciones de extracto de Boniato sobre el crecimiento de plántulas de Frijol, Pepino y Sorgo en condiciones controladas.

3.2.1. Obtención del perfil cromatográfico por la técnica de filtración Gel.

Se preparó una columna de Sephadex G-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) con diámetro de 16 mm y altura de 40 cm y tamaño de partícula de 13-15 μm . con resolución capaz de separar sustancias cuyo peso molecular se encuentra por debajo de 700 Da. Se utilizó como eluyente agua destilada y desionizada, no solo para disminuir en lo posible, las interacciones entre la matriz y los componentes activos del pool metabólico, sino también para simular las características naturales de lixiviación y. (Gel filtration 1997). Richard, (1998).

Volumen de la muestra 300 μL .

Fase móvil: Agua destilada y desionizada.

Flujo: 1mL/min.

Volumen colectado por fracción: 2.0 mL.

Una vez que se colectan las fracciones (alrededor de 48 a 57 tubos de ensayo) se le realiza un análisis de las características físico-químicas de las fracciones (Tabla 3).

Posteriormente se lee en espectrofotómetro donde los resultados de la separación mediante filtración Gel son típicamente expresados en forma de diagrama de elusión caracterizado por señales de absorbancia a 254 nm, 260 nm y 280 nm en el espectro ultravioleta- visible modelo "génesis-6, acoplado a una Pentium-4 y utilizando el software "Visión lite" versión 2.1 de la firma Termo, perteneciente a la compañía Electrón Corporation (EAU). Estas señales se encuentran relacionadas con grupos funcionales y la proporción de los mismos en las fracciones obtenidas. (Gel Filtration, 1997).

3.2.2. Obtención del perfil cromatográfico para el pool ultrafiltrado.

La ultrafiltración es una operación básica de la industria química que permite la separación y/o concentración de las sustancias contenidas en una disolución mediante la utilización de una membrana semipermeable y bajo la acción de un gradiente de presión (Alvarez y Andrés 1991), (Pérez *et al.*, 1993).

A las fracciones obtenidas por ultrafiltración se re realizó análisis físico-químico con resultados contemplados en (Tabla 4).

En el Laboratorio de Operaciones Unitarias de La Universidad Central de Las Villas se construyó un banco de pruebas con un micromódulo de ultrafiltración para evaluar la factibilidad de utilizar las membranas en el proceso de purificación de extractos acuosos. Las longitudes entre los accesorios del sistema se determinaron siguiendo el criterio de diseño sobre la "Relación de longitudes de influencias y las especificaciones para condiciones de turbulencia" y por tanto las mismas pueden estimarse como 20 veces el diámetro interior de la tubería (Rosabal y Puyans, 1988; Henley y Seader, 2000). El material de la carcasa que conforma el módulo es de acero inoxidable y los materiales y el sistema de bombeo utilizado fueron seleccionados de forma tal que en el módulo se evitan posibles contaminaciones del producto a procesar (Fig. 1).

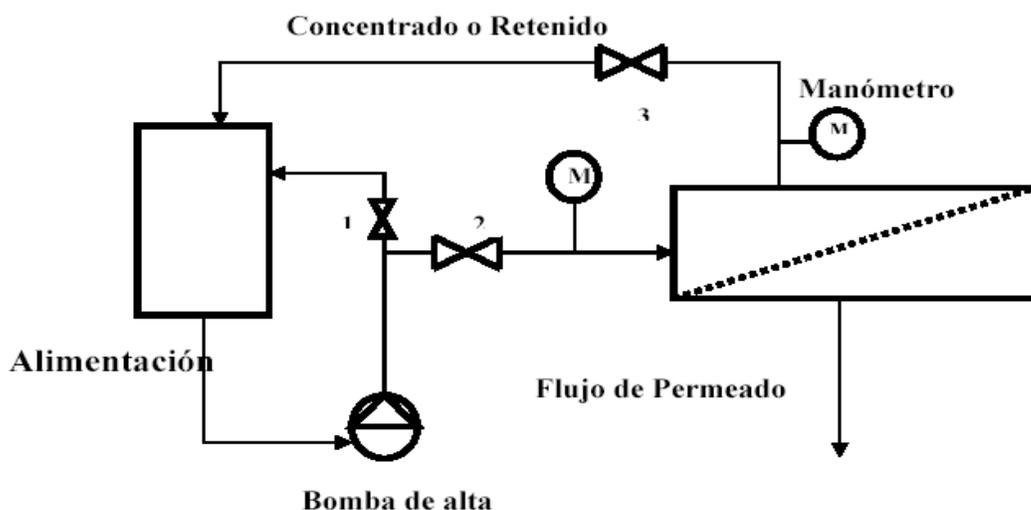


Figura 1: Esquema del módulo de ultrafiltración

Bomba-motor: compuesto por un motor eléctrico de 1 700 RPM y 0,8 KW de potencia acoplado a una bomba de desplazamiento positivo dosificadora-mezcladora Milton Roy modelo CEGA10P1T9 la cual es capaz de bombear 12 L/min y permite trabajar con flujos variables según se requiera. Este arreglo posibilita operar con presiones de hasta 5 atm (506,5 KPa) propias de este tipo de proceso.

Módulo de alimentación: Permite mantener la alimentación a la bomba cuya capacidad puede ser variable en dependencia de los requerimientos de la experimentación. En este caso se utilizó un recipiente de 5 L de capacidad para su alimentación.

Módulo de membranas: Se dispone de un módulo tubular que utiliza membranas de óxido de zirconio soportadas en carbón (grafito) de la firma CARBOSEP y se dispone de juegos de membranas con umbral de corte de 10 000 Da, 50 000 Da y 150 000 Da para el rango de ultrafiltración y de 0,14 μm (M-14) y 0,45 μm (M-45) para el rango de microfiltración. El módulo opera con una sola membrana de 0,299 m de longitud, 0,01 m de diámetro exterior y 0,006 m de diámetro interior que le confiere un área de 0,0051 m^2 .

Válvulas auxiliares: Permiten mantener los flujos y presiones deseadas dentro del sistema. La válvula 1 permite hacer desvíos del caudal en caso de que la

presión exceda los límites del tipo de filtración que se realiza y las válvulas 2 y 3 permiten controlar la presión antes y después del módulo de la membrana respectivamente.

Manómetros: Se utilizan 2 manómetros que indican al operador los valores de presión que rigen la operación y permiten registrar la diferencia de presión en el sistema.

3.3. Análisis y caracterización de las fracciones obtenidas del extracto acuoso de *I. batatas*.

El análisis completo de un pool metabólico es difícil debido a la naturaleza heterogénea de sus componentes. La cromatografía filtración gel no conlleva a una separación total de las moléculas presentes sino que permite obtener separaciones parciales que contienen metabolitos secundarios con actividad biológica específica que varía según su masa molecular.

La determinación de la presencia de grupos de compuestos para caracterizar parcialmente de la muestra, se realizó mediante diferentes métodos (espectrofotométricos en la región U.V, además análisis de parámetros como conductividad, pH, sólidos totales disueltos. Dependiendo del proceso de maceración de la muestra, conservación, tipo de especie, época de colecta, estado fisiológico de la planta, partes de tejido vegetal, los componentes del pool metabólicos se encontraran en diferentes relaciones cuali-cuantitativas.

Por consiguiente, en el análisis clásico del pool metabólico se determinaron los siguientes parámetros.

Determinación de compuestos fenolicos totales:

La determinación de la concentración de compuestos fenolitos totales, fue realizada por el método descrito Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se toma 1 ml de muestra o soluciones Standard de ácido gálico (20, 40, 60, 80 y 100 mg L⁻¹), se transfiere a un volumétrico de 25 ml conteniendo 9 ml de ddH₂O. Se añade 1 ml de solución Folin & Ciocalteu's, se agita la solución. A los 5 minutos, se añaden 10 ml de solución 7 % de Na₂HCO₃, se agita y se

completa el volumétrico con ddH₂O, se mezcla. Se incuba la a 23 °C durante 90 min. Se lee la absorbancia a 750 nm. Los compuestos fenolitos totales son expresados en mg equivalentes de ácido gálico AGE/100 g de muestra fresca. Las muestras se realizan por triplicado. Las concentraciones se calculan mediante la función matemática obtenida en el ajuste de la curva de calibración.

Determinación de compuestos flavonoides totales: La determinación de la concentración de compuestos fenolitos totales, fue determinada por el método calorimétrico descrito por Zhishen *et al.*, (1999). Se toma 1 ml de muestra o soluciones Standard de luteolina (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L), se transfiere a un volumétrico de 10 ml conteniendo 4 ml de ddH₂O., a tiempo 0, se añaden 0.3 ml de Na NO₂ 5 %, se agita la solución. A los 5 minutos, se añaden 0.3 ml de ALCL₃ 10 %. Pasado 6 minutos, se adicionan 2 ml de NaOH 1N, finalmente se completa el volumen con ddH₂O. Se lee la absorbancia a 510 nm. Los compuestos fenolitos totales son expresados en mg equivalentes de luteolina LUE/100 g de muestra fresca. Las muestras se realizan por triplicado. Las concentraciones se calculan mediante la función matemática obtenida en el ajuste de la curva de calibración.

Sólidos Totales Disueltos (TDS): Es un valor muy significativo desde el punto de vista cuantitativo ya que cuantifica la presencia de sólidos disueltos en las muestras de análisis y mediante el mismo se puede calcular las dosis aplicar en los ensayos biológicos. Se determinó utilizando el pH- metro/conductímetro (Inolab level 1)

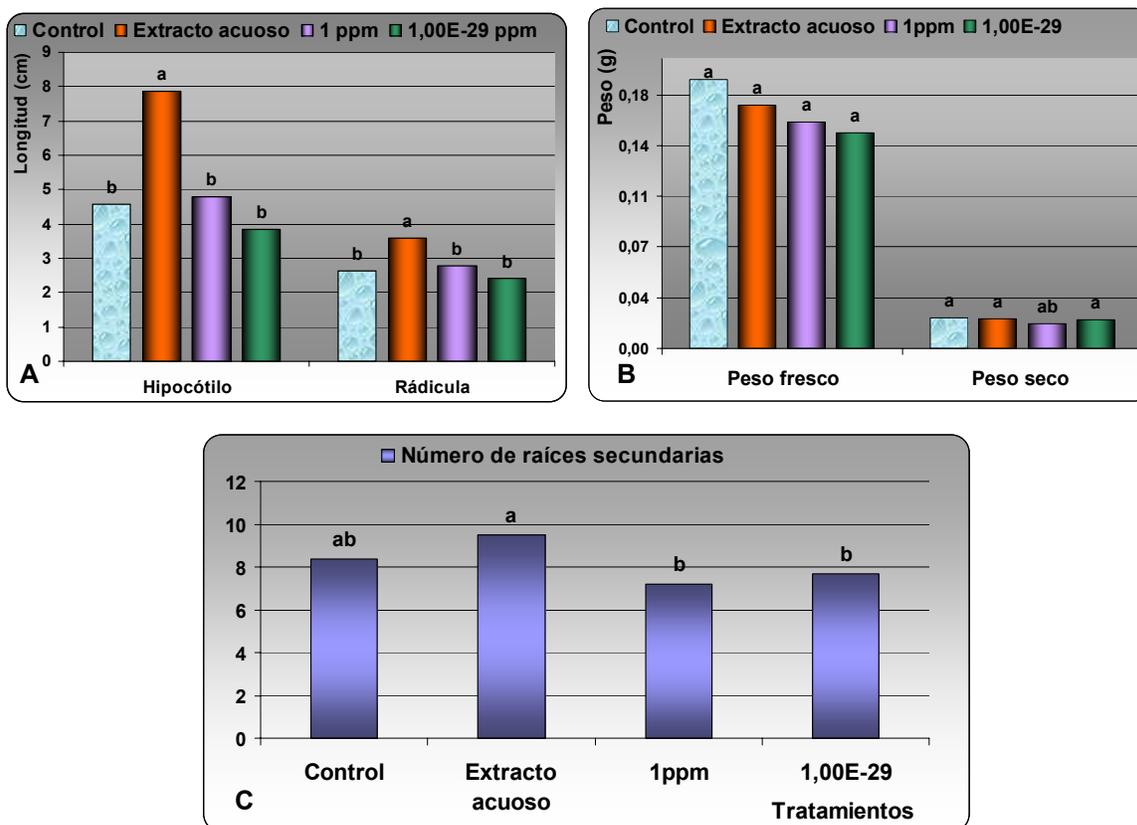
Conductividad: El flujo de corriente eléctrica involucra el transporte de cargas eléctricas, por lo tanto, el hecho de que las fracciones acuosas conduzcan la corriente eléctrica, implica la presencia de especies disociadas que generan iones relacionados con la disociación de ácidos orgánicos como cinnámico, cafeico, benzoico, p-hidroxibenzoico y otros también de naturaleza orgánica responsables de actividades alelopáticas. Por otro lado permite el seguimiento, control y caracterización del pool metabólico.

Potencial hidrogénico (pH): En los extractos vegetales pueden encontrarse varios tipos de compuestos, los cuales confieren a cada extracto en particular, diferentes pH. A nivel molecular las diferencias están dadas por la naturaleza de las especies químicas, distribución y número de grupos carbonilo e hidroxilos presentes. Además, puede asociarse con la ocurrencia de procesos fermentativos durante el almacenamiento. Permite al igual que la conductividad el seguimiento, control y caracterización del pool metabólico.

Capítulo 4-Resultados y Discusión.

4.1. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de plántulas de pepino.

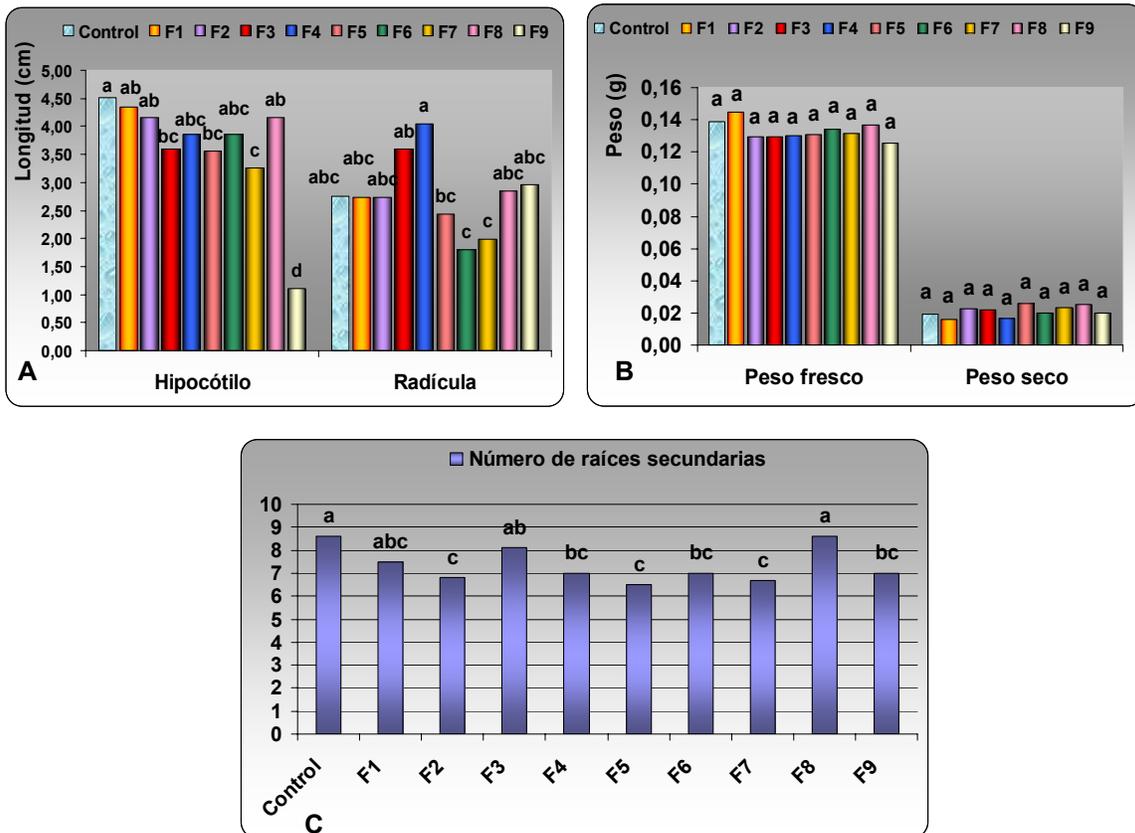
El extracto acuoso de *I. batatas* manifestó una estimulación en el cultivo del pepino en las variables longitud del hipocótilo y longitud de la radícula alcanzando un 72 y 37% de estimulación respectivamente, mientras que no afectó al número de raíces secundarias, peso fresco y peso seco de las plántulas de pepino. Las diluciones del mismo no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables medidas. (Fig. 2).



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco y número de raíces secundarias, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$.

Figura 2: Efectos de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *I. batatas* sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *C. sativus*.

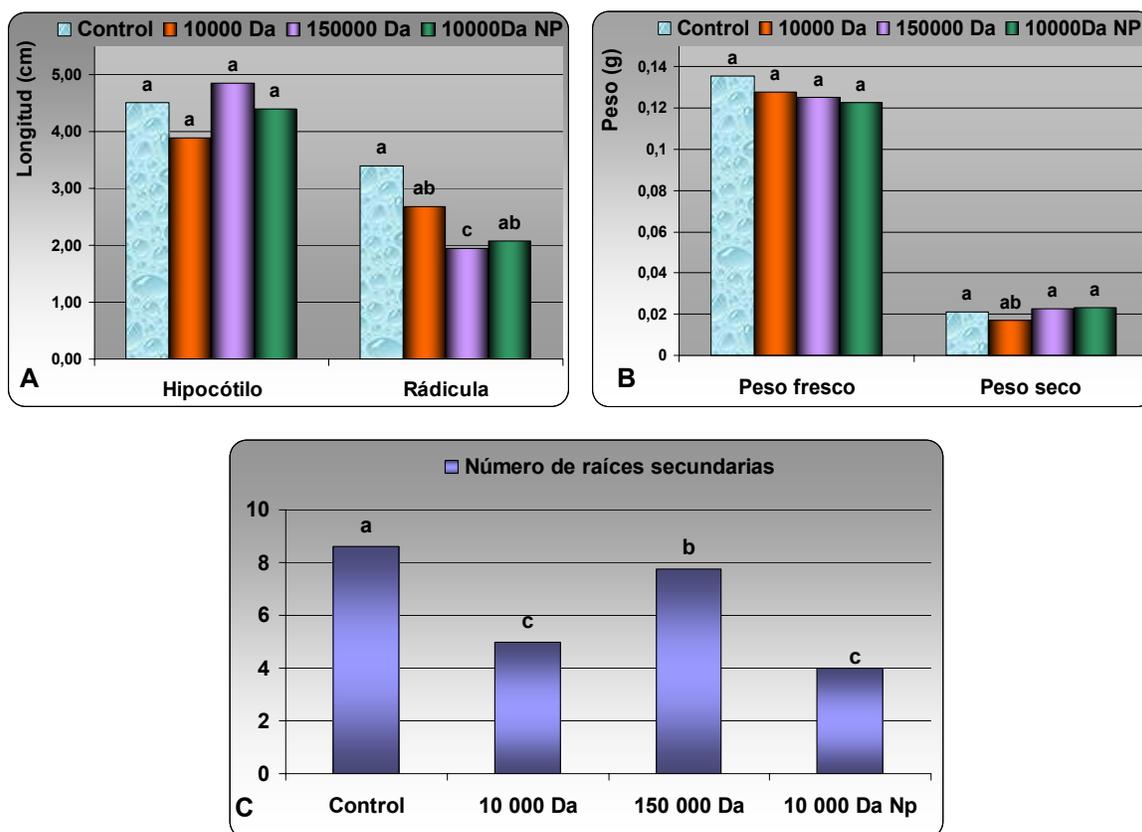
Las fracciones obtenidas por el método de fraccionamiento filtración Gel con Sephadex G-10 afectaron el crecimiento del hipocótilo de las plántulas de pepino, pero significativamente solo las fracciones 3, 5, 7 y 9 con 20, 21, 28 y 75% de inhibición, mientras se evidenció que no surtió efecto alguno sobre el peso seco y fresco. La formación de raíces secundarias se vio afectada por las fracciones 2, 4, 5, 6, 7 y 9 pero la que más afectó fue la fracción 5 con 24% de respuesta inhibitoria. (Fig. 3)



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco y número de raíces secundarias, medias con letras desiguales difieren por Tukey para $p < 0.05$.

Figura 3: Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica filtración Gel sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *C. sativus*.

Los tratamientos obtenidos por el método no convencional de fraccionamiento Ultrafiltración (10 000 Da, 150 000 Da y 10 000 Da Np) no afectaron la longitud del hipocótilo, mientras el tratamiento de 150 000 Da redujo al 50% el crecimiento de la radícula. El número de raíces secundarias también fue afectado en los tres tratamientos siendo el más significativo 10 000 Da Np con 53% de respuesta inhibitoria. Con respecto a las a variable peso fresco y peso seco no se produjeron alteraciones (Fig. 4).



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco y número de raíces secundarias, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$.

Figura 4: Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica de Ultrafiltración sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *C. sativus*.

Al respecto, An *et al.*, (2005) encontró un modelo dosis respuesta para el estudio de los efectos alelopáticos, del cual se deduce que la actividad estimulante del extracto acuoso puede ser debida a que en la proporción de macerado (peso/volumen) de la muestra se logró un punto de concentración de los aleloquímicos, cercano al máximo de actividad estimulante (punto máximo en el área de estimulación). Basados en este mismo modelo se explica que el efecto inhibitorio de las disoluciones del extracto acuoso, con la disminución de la concentración, puede ser debido a que en esa misma medida la concentración de los aleloquímicos disminuye y el punto de máxima actividad se corre hacia la izquierda de la curva, acercándose al efecto logrado por el control, pues la diferencia no es significativa. En tanto, el efecto inhibitor sobre la longitud de la radícula, expresada por las fracciones F3, F5, F7 y F9, obtenidas mediante cromatografía filtración Gel, primeramente permitió aislar fracciones más puras en las cuales se refuerzan los efectos inhibitorios y en segundo, advierte las potencialidades de esta técnica en la separación y purificación de entidades moleculares con actividad alelopática. Es significativo destacar que en estas fracciones se detectó presencia de compuestos fenólicos en general y flavonoides en específico, compuestos relacionados con los efectos inhibidores en el desarrollo de plántulas de pepino. Politycka (2004) y expresan que este efecto inhibitorio sobre el cultivo de pepino, podría ser consecuencia de la altas concentraciones de compuestos fenólicos en el sustrato, los cuales pueden iniciar un incremento de la peroxidación lipídica en el plasmalema, precedido por transformaciones oxidativas de los compuestos fenólicos, vía oxidación enzimática (peroxidadas) en las paredes celulares, liberando peróxido de hidrógeno, agente desencadenante de especies reactivas (radicales libres) que pueden causar efectos de deterioro en los tejidos del cultivo.

Es significativo destacar que las técnicas de fraccionamiento utilizadas, en gran medida, producen una separación de los aleloquímicos en base a las diferentes masas moleculares, y que en nuestro caso, a medida que aumentó la concentración y la separación de los activos biológicos se incrementó el efecto inhibitor (Figuras 2, 3 y 4), aspecto que advierte las potencialidades de una

operación básica de la industria química que permite la separación y/o concentración de las sustancias contenidas en un extracto, mediante la utilización de membranas semipermeables bajo la acción de un gradiente de presión (Alvarez y Andrés 1991; Pérez, 1993). Estas operaciones pueden complementar o reemplazar los métodos tradicionales de laboratorio, pudiendo reducir los costos, los problemas de equipamiento y el peligro de contaminación de los extractos, incrementándose a otra escala la recuperación del producto con igual o mayor pureza, entre otras (Sullivan y Espetien, 1984).

Pazmiño (1999) ha reportado que compuestos fenólicos de diferentes naturaleza (cumarinas y flavonoides) estimulan la actividad del sistema oxidásico de la auxina (Oxidasa del AIA), disminuyendo por tanto los niveles de AIA, que puede estimular el crecimiento de la raíz, por lo que es de esperar el incremento producido en la longitud de las mismas tratadas con las diferentes fracciones (Figura 3).

Contrario a estos resultados, Li *et al.*, (1993) demostró que la aplicación de diferentes compuestos fenólicos de carácter ácido (ácido ferúlico y p-cumárico) en el sustrato inhiben el crecimiento de la raíz en plántulas de pepino, fenómeno observado para las fracciones F5, F6 y F7.

Aunque el contenido de compuestos fenólicos son medidos al inicio del experimento, y no durante la conducción del mismo, para revelar una curva de fluctuaciones durante el desarrollo radicular y asociar la perturbación enzimática con estos indicadores (Blilou *et al.*, 2000; Volpin *et al.*, 1994.), podemos decir que su naturaleza y concentración son los responsables de este efecto.

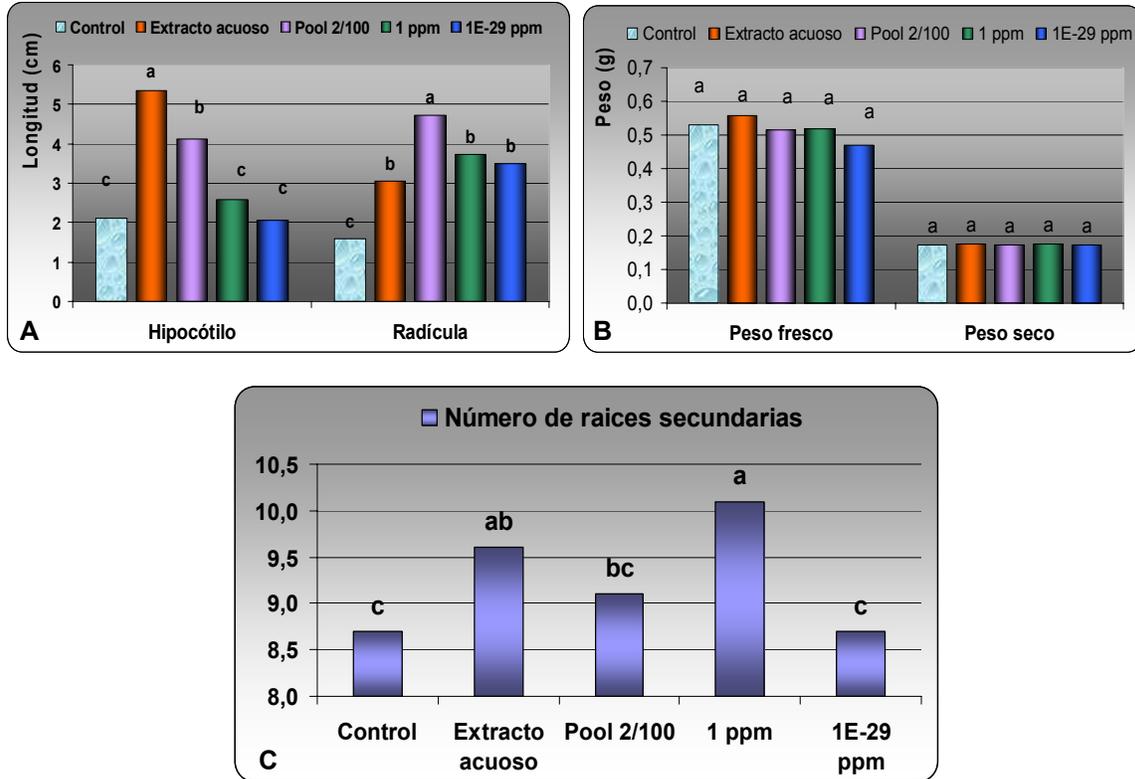
Por otro lado, en la (Figura 4) se aprecia el potencial alelopático de las fracciones F3, F5, F7 y F9 obtenidas mediante cromatografía filtración Gel, las que produjeron magnitudes cuantitativamente menores de la longitud del hipocotilo en el pepino, lo que evidencian el carácter significativamente inhibitor de las entidades moleculares (aleloquímicos) responsables de esta efecto con respecto al testigo.

4.2. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de plántulas de frijol.

Con la excepción del tratamiento 10^{-30} ppm el extracto acuoso estimuló el crecimiento tanto del hipocótilo como de la radícula de la plántula de frijol. El

tratamiento (Extracto acuoso) 8100 mg L^{-1} , creció 2.5 veces más que el control y fue el de contribución al efecto estimulante del hipocótilo seguido por dilución (162 mg L^{-1}) la cual estimuló 1.9 veces más que el testigo. En el caso de la radícula los diferentes tratamientos estimularon pero la concentración de 162 mg L^{-1} manifestó el mayor potencial triplicando el valor con respecto al control a continuación, $1; 10^{-30}$ y 8100 mg L^{-1} duplicaron el crecimiento del control (Fig. 5). Los cambios fisiológicos en plantas expuestas a la acción de los aleloquímicos son dependientes de la naturaleza y concentración de entrada; la respuesta es de estimulación o atracción, con bajas concentraciones de aleloquímicos y de inhibición o rechazo al incrementarse el nivel de los mismos (Lovett, 1989, citado por (An *et al.*, 2000)

Con respecto a la formación de raíces secundarias los tratamientos 1 y 8100 mg L^{-1} fueron capaces de incrementar el valor de estimulación en 16 y 10% respectivamente por encima del control. Por el contrario los pesos frescos y secos no se afectaron con los tratamientos aplicados (Fig. 6).



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco y número de raíces secundarias, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$.

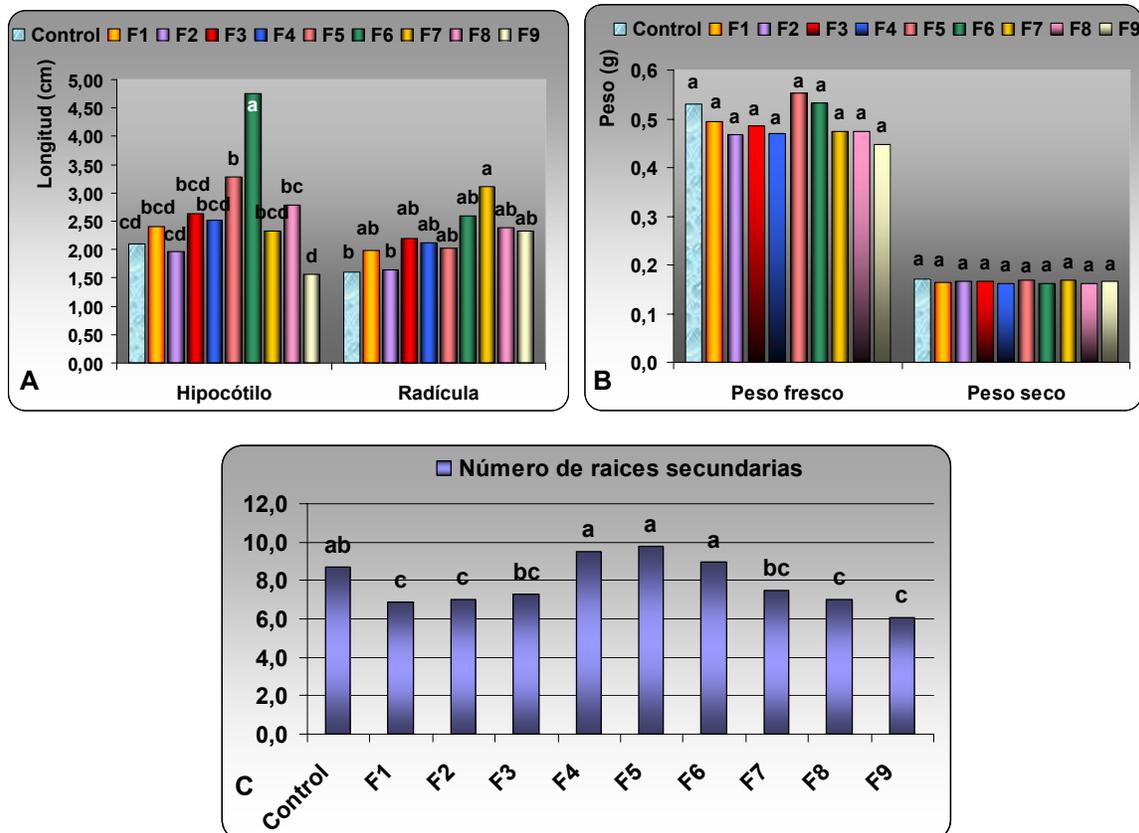
Figura 6: Efectos de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *I. batatas* sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *P. vulgaris*.

Por otro lado de las 9 fracciones obtenidas mediante filtración Gel, solamente dos F6 y F5 manifestaron actividad estimulante frente al hipocótilo, estimulando su crecimiento 2 y 1.5 veces más que el control mientras las restantes fracciones no expresaron diferencias estadísticamente significativas para esta variable (Fig. 7). Estos resultados se ajustan a los modelos y consideraciones teóricas expresadas por (An et al., 2005) en cuanto a que la disminución de la concentración puede originar incrementos en los efectos alelopáticos específicamente los relacionados con la estimulación.

Los resultados para la longitud de la radícula expresan carácter estimulante solamente para la fracción 7 duplicando la longitud con respecto al control. El resto de las fracciones no manifestaron diferencias estadísticamente significativas.

La formación de raíces secundarias se vio afectada en un 22 % por las fracciones 1, 2, 8 y 9 por debajo del control. El resto de las fracciones no modificaron significativamente el proceso inhibición/estimulación, en la misma medida tampoco se afectaron el peso fresco y el peso seco.

Es necesario puntualizar que el desarrollo de estudios alelopático de efectos interactivos entre factores de competencia, es necesario aumentar y/o disminuir los niveles de ese factor en el sustrato. Sin embargo, en la realización de estudios no pueden ser separados los efectos de competencia por las dianas moleculares en las diferentes partes de la planta ya que los mismos ocurren de forma simultánea y ello tributará a incrementar en parte la complejidad del sistema por ello en nuestro caso resulta difícil explicar un comportamiento de estimulación/inhibición frente al hipocótilo sin que el mismo este vinculado de forma directa o indirecta con alguna transformación en la raíz, hipocótilo o número de raíces secundarias máxime cuando nuestros tratamientos son de hecho heterogéneos en composición (John *et al.*, 2006). Chon y Boo (2005) comprobó un efecto inhibitorio de extractos de partes del boniato sobre el crecimiento radicular de Alfalfa (*Medicago sativa* L.), efecto que fue mayor para los extractos de hojas, seguidos por los de tallos y los de raíces. De lo cual sugirió que la planta de boniato es potencialmente alelopática, dependiendo su actividad de la parte de la planta que se utilizara y del color de la peridermis.



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco y número de raíces secundarias, medias con letras desiguales difieren por Tukey para $p < 0.05$.

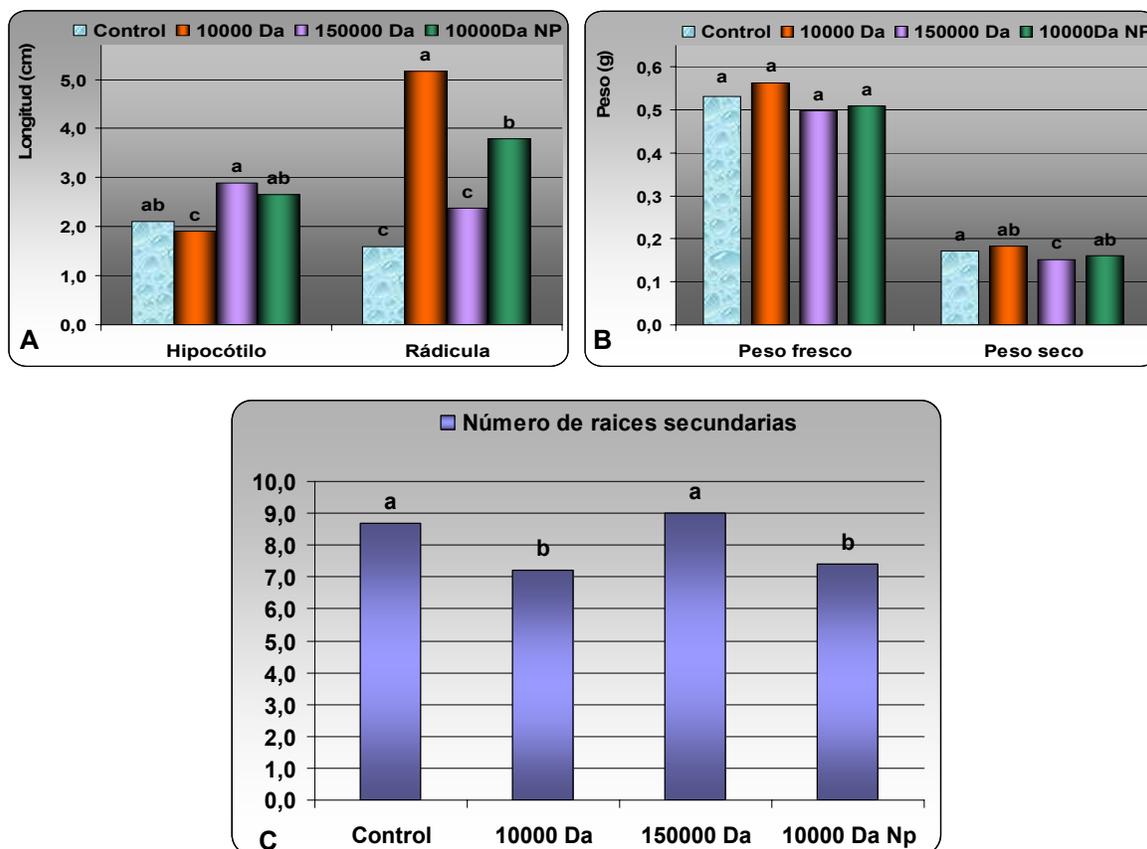
Figura 7: Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica filtración Gel sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *P. vulgaris*.

De los tratamientos relacionados con la ultrafiltración, 10000 Da inhibió el crecimiento del hipocótilo con un 9% de respuesta por debajo del control, los demás tratamientos no tuvieron diferencias con el control. Estos resultados se justifican por la acción estimulante que sobre las AIA-oxidasas pueden ejercer determinados compuestos fenólicos dentro de los que cabe señalar dentro de los di y polifenoles: ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y protocatéquico.

Sin embargo la longitud de la radícula se vio estimulada con 10 000 Da y 10 000 Da Np 3 y 2 veces respectivamente más que el control, 150 000 Da no tuvo diferencias con el control. Cabe señalar que en dependencia del órgano de la

planta y los niveles hormonales inducidos por la naturaleza y niveles de compuestos monofenoles inductores dentro de lo que cabe mencionar ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico, p-cumárico y siríngico que estimulan la AIA-oxidasas induciendo a una disminución de la hormona AIA libre. Peterson *et al.* (2002), obtuvo al menos 8 fracciones de extractos de cortex de Boniato que inhibían la germinación de *Panicum milliaceum* L. (Millo), detectando la presencia de ácidos fenólicos como caféico, clorogénico, p-cumárico, *trans*-cinámico e isómeros del ácido dicafeoil quínico, los cuales se hallaban hasta en un 96% del total de los fenoles, así como niveles elevados de cumarinas como la escopoletina y su glucósido, la escopolina.

El número de raíces secundarias estuvo influenciada negativamente por los tratamientos 10 000 Da y 10 000 Da con un 16% de inhibición. El tratamiento de 150 000 Da no tuvo diferencias con el control (Fig. 8). Las variables peso fresco y peso seco no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos.

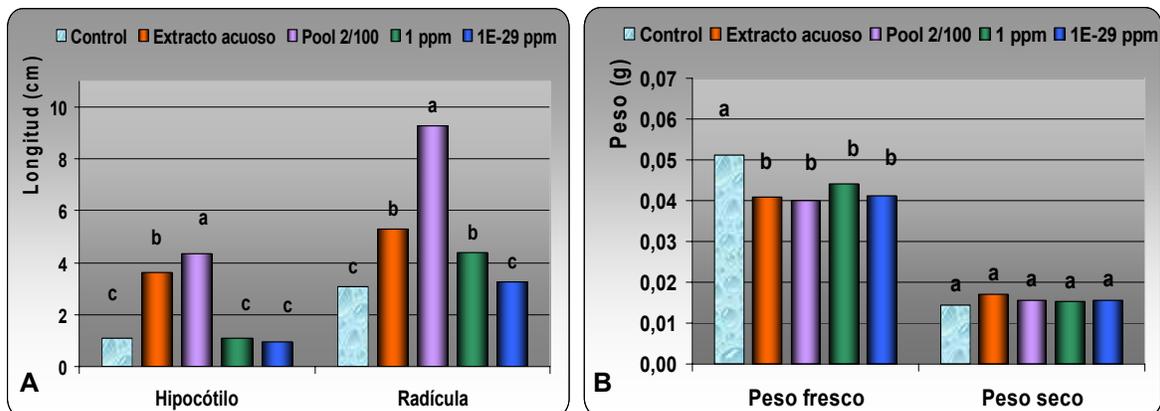


Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco y número de raíces secundarias, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$.

Figura 8: Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica de Ultrafiltración sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *P. vulgaris*.

4.3. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de plántulas de sorgo.

La dilución 162 mg L^{-1} del extracto acuoso de *I. batatas* estimuló el crecimiento del hipocótilo y la radícula en plántulas de sorgo, aunque el extracto acuoso tuvo menor estimulación del crecimiento, en ambos órganos, con valores por debajo de la dilución 162 mg L^{-1} . El peso fresco fue afectado en todos los casos con un 19% de afectación (Fig. 9).



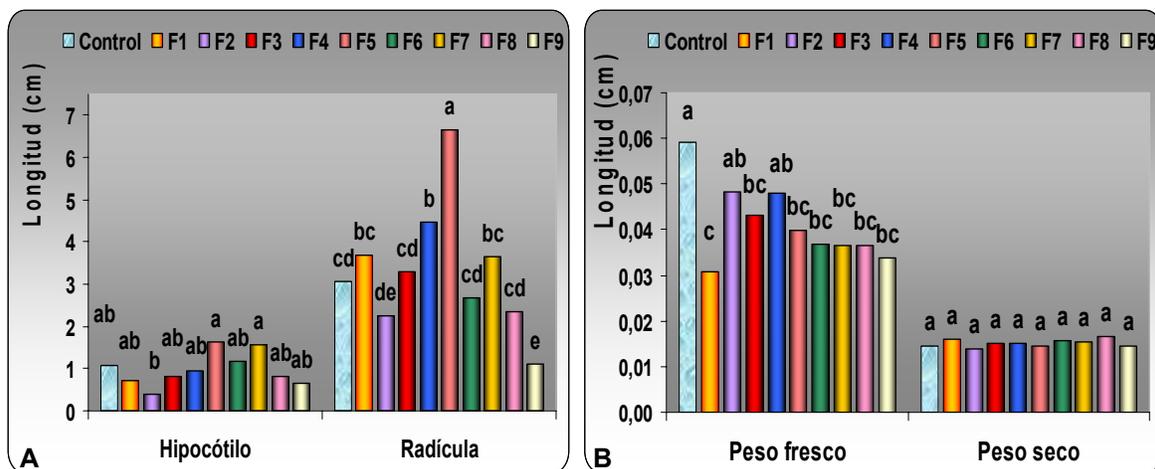
Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$.

Figura 9: Efectos de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Ipomoea batatas* (L) Lam. Sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas *S. vulgare*.

Las fracciones obtenidas por métodos convencionales no se diferenciaron del control con respecto a la longitud del hipocótilo. Para la longitud de la radícula las fracciones 4 y 5 manifestaron una estimulación de 1.5 y 2 veces más que el control, lo que se atribuye a la presencia en éstas de Flavonoides como Epigenina y Narigenina, las cuales estimulan las AIA oxidasas (Sampietro, 2001), lo cual produce disminución de la concentración de ácido indolacético que favorece el desarrollo radicular (Einhelling, 2004). Evidentemente, los principales cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas se dan como respuestas a proporciones hormonales que pueden inducir el crecimiento, el rejuvenecimiento y en fin el desarrollo de la planta en general. Podría ser que las variadas respuestas en el crecimiento de tallos y raíces se debiera a la diferente sensibilidad que muestran los distintos órganos a las concentraciones de hormonas, específicamente AIA, siendo las raíces las más sensibles, seguidas por las yemas y los tallos (Acosta *et al.*, 2001).

Sin embargo la fracción 9 manifestó un 61% de inhibición por debajo del control. El resto de las fracciones se comportaron similares al control. El peso fresco se redujo con todas las fracciones, excepto las 2 y 4 que se comportaron similares al

control. La fracción 1 produjo la afectación más marcada, con un 49% de inhibición. El peso seco no sufrió alteraciones (Fig. 10).

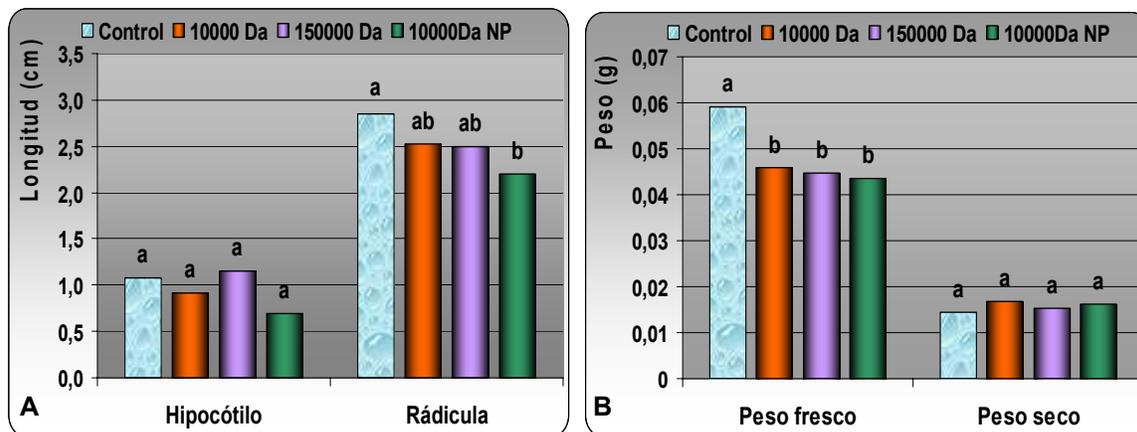


Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco, medias con letras desiguales difieren por Tukey para $p < 0.05$.

Figura 10: Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica filtración Gel sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), número de raíces secundarias (C) de plántulas de *S. vulgare*.

Los tratamientos de ultrafiltración no produjeron efecto alguno en las variables longitud del hipocótilo y de la radícula, excepto el tratamiento de 10 000 Da Np, el cual produjo una inhibición del 30% en la longitud de la radícula de las plántulas de sorgo. Chon y Boo (2005) comprobó un efecto inhibitorio de extractos de partes del boniato sobre el crecimiento radicular de Alfalfa (*Medicago sativa* L.), efecto que fue mayor para los extractos de hojas, seguidos por los de tallos y los de raíces. De lo cual sugirió que la planta de boniato es potencialmente alelopática, dependiendo su actividad de la parte de la planta que se utilizara y del color de la peridermis.

Todas afectaron negativamente el peso fresco de plántulas de sorgo en un 35%. El peso seco no sufrió alteraciones (Fig. 11). El planteamiento anterior podría estar influenciado por el tiempo de muestro.



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$

Figura 11: Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica de Ultrafiltraón sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), de plántulas de *S. vulgare*.

4.4. Caracterización de las fracciones obtenidas por filtración Gel.

A partir del análisis cromatográfico del extracto acuoso de *I. batatas* se obtuvieron 57 alícuotas de 2 ml que posteriormente se agrupan en 9 fracciones bien definidas según su perfil cromatográfico (Fig.12). Las diferentes fracciones se caracterizaron mediante los parámetros químico-físicos sólidos totales disueltos, conductividad, pH, salinidad (Tabla 2 y 3).

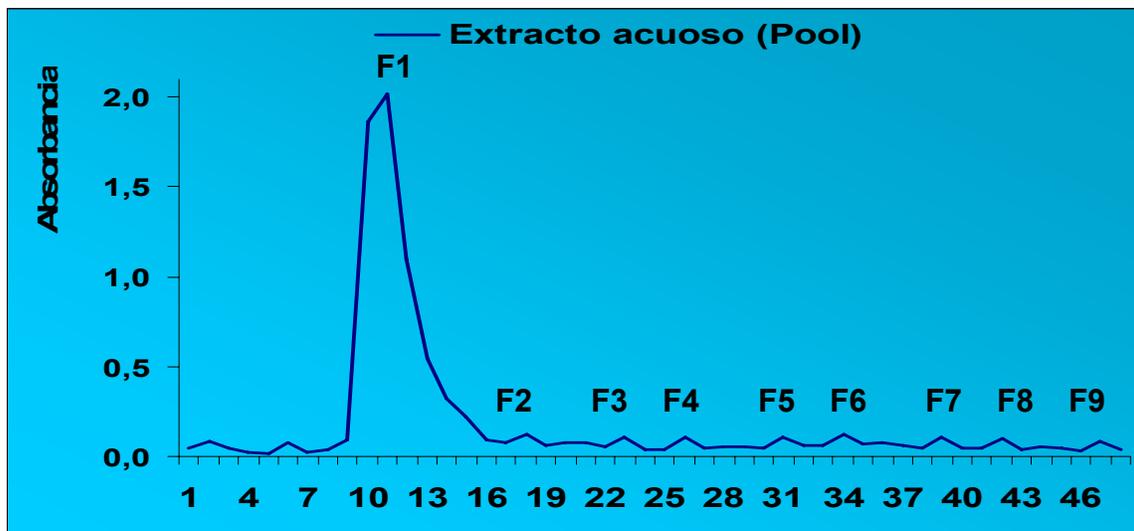


Figura 12. Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas a través de gel filtración.

Los resultados del fraccionamiento sobre Sephadex G-10 no coinciden en números y de fracciones y magnitud de los parámetros químicos-físicos con los reportados por Puente (2007), aspecto que no se contradice en principio por cuanto la naturaleza y concentración de los compuestos fenólicos presentes en los tejidos dependen del tipo de especie, variedad, fenología, latitud geografía, estación; además de otros factores externos tales como temperatura ambiente, luz, predación, stress (Yao *et al.* 2007).

En la (Fig.13) se puede apreciar el contenido de compuestos fenólicos y específicamente dentro de estos los flavonoides arrojando que en la fracción 1 el 90% aproximadamente son flavonoides, en la fracciones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 el contenido de flavonoides oscila entre 60 y 62%, mientras que en las fracciones 8 y 9 el nivel de flavonoides disminuye hasta 57 y 59% respectivamente. Peterson *et*

al. (2002), obtuvo al menos 8 fracciones de extractos de cortex de Boniato que inhibían la germinación de *Panicum milliaceum* L. (Millo), detectando la presencia de ácidos fenólicos como caféico, clorogénico, *p*-cumárico, *trans*-cinámico e isómeros del ácido dicafeoil quínico, los cuales se hallaban hasta en un 96% del total de los fenoles, así como niveles elevados de cumarinas como la escopoletina y su glucósido, la escopolina.

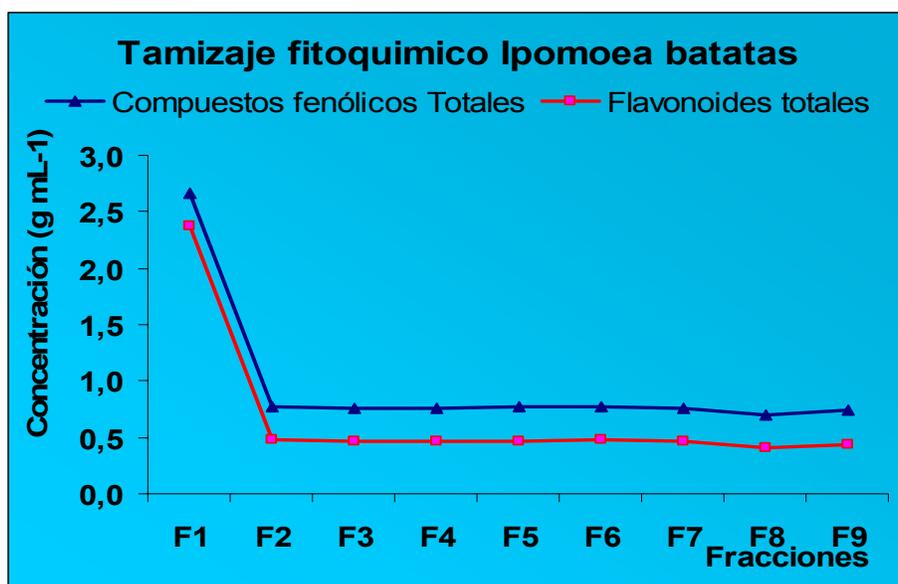


Figura 12. Contenido de Compuestos fenoles totales y Flavonoides totales de las fracciones.

Tabla 2: Características físico-químicas del extracto acuoso de *I. batatas.*, y las diluciones del mismo.

	pH	Cond (mS cm ⁻¹)	Sald.	TDS (mg L ⁻¹)	Temp (°C)
Ext. acuoso (8100 ppm)	5,5	2300	0,0	8100	26,1
162 ppm	6.3	188.6	0,0	162	26,1
1 ppm	6.1	6.0	0,0	1	26,1
10 ⁻³⁰ ppm	6.5	3.5	0,0	10 ⁻³⁰	26,1

Tabla 3: Características Físico-químicas de las fracciones del extracto acuoso de *I. batatas.* Obtenidas con cromatografía de Gel.

	pH	Cond (mS cm ⁻¹)	Sald.	TDS (mg L ⁻¹)	Temp (°C)
F1	6.5	131	0,0	117	26.3
F2	6.3	22	0,0	20	26.3
F3	6.3	13	0,0	12	26.3
F4	6.6	14,4	0,0	13	26.3
F5	6.4	17,1	0,0	15	26.3
F6	6.4	10,7	0,0	10	26.3
F7	6.5	8,9	0,0	8	26.3
F8	6.5	9,4	0,0	8	26.3
F9	6.0	16	0,0	14	26.3

4.5. Características de las fracciones obtenidas con ultrafiltración.

En la (Fig. 13) se puede apreciar los cromatogramas de las fracciones 150 000 y 10 000 Da respectivamente donde se puede apreciar las características del método, concentrando y purificando los metabolitos secundarios. Mediante esta técnica se pueden aislar las fracciones que manifiestan actividad biológica marcada y realizar obtenciones a mediana y gran escala.

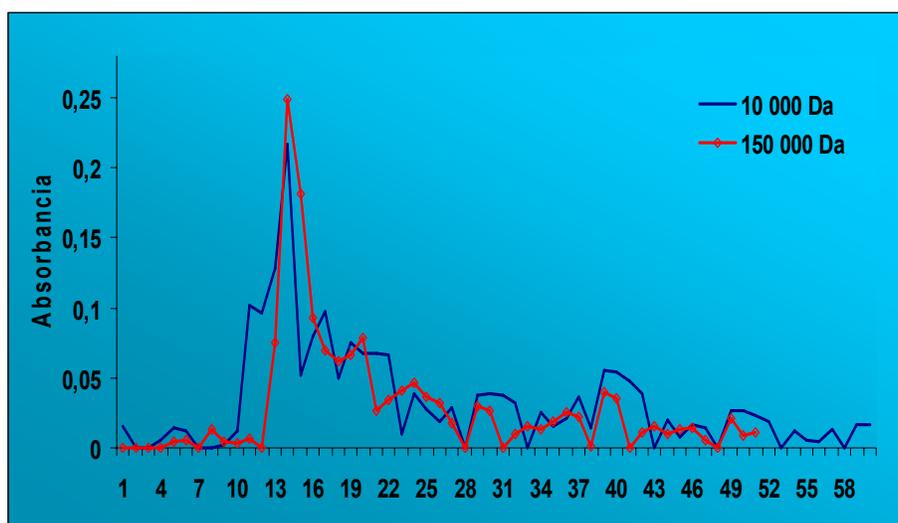


Figura 13. Perfil cromatográfico de las fracciones 150 000 y 10 000 Da obtenidas por ultrafiltración.

Tabla 4: Características Físico-químicas de las fracciones del extracto acuoso de *I. batatas*. Obtenidas con ultrafiltración.

	pH	Cond (mS cm ⁻¹)	Sald.	TDS (mg L ⁻¹)	Temp (°C)
10 000 Da	5.4	4.89	2.6	6500	26.3
150 000 Da	5.3	4.35	2.2	5200	26.3
10 000 Da Np	5.4	4.70	2.4	5700	26.3

Capítulo 5-Conclusiones.

1. El extracto acuoso de *I. batatas*, sin diluir, estimuló el crecimiento tanto del hipocótilo como de la radícula de las plántulas de *C. sativus*.
2. De las nueve fracciones obtenidas por filtración Gel, ninguna afectó el crecimiento longitudinal de radícula, aunque las fracciones 2, 4, 5, 6, 7 y 9 disminuyeron el número de raíces secundarias y las 3, 5, 7 y 9 inhibieron el crecimiento del hipocótilo del pepino.
3. De las tres fracciones obtenidas por ultrafiltración ninguna manifestó actividad sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo, mientras que 150 000 Da, inhibió el crecimiento de la radícula, y todas afectaron negativamente la formación de raíces secundarias.
4. El extracto acuoso de *I. batatas* estimuló el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula de plántulas de *P. vulgaris*.
5. Se logró identificar la presencia cuali-cuantitativa de compuestos fenólicos y en específico flavonoides entre un 60 y 90%.
6. Las fracciones 4 y 5 obtenidas mediante la técnica de filtración gel estimularon significativamente al hipocótilo en plántulas de *P. vulgaris*.
7. La aplicación del concentrado obtenido por ultrafiltración con corte de 10 000 Da, inhibió el alargamiento del hipocótilo, mientras estimuló la radícula en plántulas de *P. vulgaris*, evidenciándose el carácter hormonal de los metabolitos separados mediante dichos procesos.
8. Debido a la naturaleza y niveles de los agentes alelopáticos se pudo apreciar una variabilidad en función de la estructura química la cual permite una multitud de patrones de sustitución, con marcada estimulación sobre plántulas de *S. vulgare*, en las fracciones 4 y 5, mientras que en la 9 hubo una inhibición significativa, lo que demuestra la viabilidad del proceso de separación por filtración Gel con Sephadex G-10.

6. Recomendaciones.

1. Profundizar en el estudio de la constitución fenológica de las fracciones del extracto acuoso de *Ipomoea batatas* (L). Lam mediante otros tamizajes fitoquímicos y la corrida en placa delgada de patrones conocidos para determinar los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en cuestión.
2. Probar las fracciones del extracto acuoso en otras especies de interés agrícola.
3. Probar en condiciones de campo este experimento.

Capítulo 7-Bibliografía.

1. Acosta, E.M., Sánchez, B.J., Bañón, A.M. (2001). Auxinas. Fundamentos de Fisiología Vegetal. España: 305-323p.
2. Alvarez Ricardo y Andrés J L. (1991). Recuperación de proteínas del lactosuero. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Oviedo. España.
3. An, M., Pratley, J. E., Haig, T (2005). Whole-range assessment: a simple method for analysing allelopathic dose-response data *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, 3: 245–260.
4. Anaya, L, Ana Luisa y Espinosa, G, F, J. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. “Ciencias 83”. Mexico. 10 p.
5. Anaya,A. L. 1989. La alelopatía y el manejo de los recursos naturale: mitos, realidades y perspectivas. Resumen la Reunión de Ecología Química. Instituto de Fisiología Celular y Centro de Ecología, Universidad Autónoma de México. UNAM. 48 pp.
6. Andrés, A. A., y Cadavid, L. F. (2003). Producción y uso de batata. Sistema de producción de Yuca- Clayuca, Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y el desarrollo de la yuca. 2003. Consultado en: **[http://flar.org/training/pdf/061018 Sistemas Produccion Batata-A Alban.pdf](http://flar.org/training/pdf/061018_Sistemas_Produccion_Batata-A_Alban.pdf)** **27/5/08.**
7. Andrés, A. y Cadavid, L, F. 2000. Producción y usos de batatas. Consorcio Latino Americano y del Caribe de apoyo a la Investigación y desarrollo de la Yuca (CLAYUCA). Consultado el 18 de diciembre de 2007 en **[www.ciat.cgiar.org/training/pdf/061018 Sistemas Produccion Batata-Alban.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/training/pdf/061018_Sistemas_Produccion_Batata-Alban.pdf)**
8. 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.
9. Appel, H. (1993). Phenolics in ecological interactions: The importance of

- oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 12: 1521-1552.
10. Artieri, M. A; Hecht, Susanna; Liebman, M; Magdoff, F; Norgaard, N y Sikor, T.O. (1997). *Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable*. 3ra Edición, CLADES. La habana, Cuba. 249 p.
 11. Aziz, A., Martin-Tanguy, J. and Larber, F. (1998). Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate praline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum*. 104: 195-202.
 12. 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.
 13. Bartozs, G. (1995). *The second face of oxygen*. Warsaw: Panstwowe Wydawnictwo Naukowe. 372 pp.
 14. Bembaries Ivars and Neely Karen. Ultrafiltration as a competitive unit process. *Chemical Engineering Progress*. USA. November 1986, pp 29-40.
 15. Blilou, I. and Garcia-Garrido, J.M (2000). Induction of LTP (lipid transfer protein) and PAL (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany* 51:1969-1977.
 16. Blum, L. and Kogan, M. (1992). Allelopathy in plant. *Allelopathy Journal* 2 (2): 16-23.
 17. Blum, U. and Ebercon, A. (1981). Cell membrane stability as a measure of drought and tolerance in wheat. *Crop Science* 21: 43-47.
 18. Boudet, A-M. (1998). A new view of lignification. *Trends of Plant Science* 3:67-79.
 19. Carson, G. (2007). "Where do the tannins that show up in water come from and where are they most likely to be found in water supplies?_" USDA CSREES Visitado 11 de marzo, 2007, Dirección Electrónica: http://www.aces.edu/waterquality/faq/faq_results.php3?rowid=3814
 20. Carson, Rachel. (1964). *Primavera silenciosa*, 1ra Edición. Barcelona, España. 344 p.

21. Chon, S.U. and Boo, H.O. (2005). Difference in Allelopathic Potential as Influenced by Root Periderm Colour of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 191 (1): 75–80p.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Duke, S. O., Rimando, M.A., Dayan, F.E., Canel, C., Wedge, D.E., Tellez, M.R., Schrader, K.K., Weston, L.E., Smillie, T.J., Paul, R.N., Duke, M.A. (2000). Strategies for the discovery of biactive phytochemicals *Phytochemicals as bioactive Agents* W. R. Bidlack, Omaye, S.T., Meskin, M.S., Topham, D.K.W. . Lancaster, P.A., Technomic Publishing Co.: 1-20.
26. 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.
27. Einhellig, F. A. (2004). Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*, (Eds., F. A. Macías, I. C. G. Galindo, I. M. G. Molinillo and H. G., Cutler), pp. 217-38. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
28. 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.
29. Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z. and Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* 100: 234-240.
30. Federico, R., Angelini, R., Cona, A. and Niglio, A. (1992). Polyamine

- oxidase bound to cell walls from *Zea mays*_seedlings. *Phytochemistry* 31: 2955-2957.
31. 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.
 32. Geron, R. (2007). "Taninos." Visitado 29 de marzo, 2007, Dirección Electrónica: <http://www.elergonomista.com/fitoterapia/taninos.htm>
 33. Gómez Clemencia, A. R., Arévalo Ligia Patricia, Delgado Cecilia, Guzmán Marta Rocío, León Sandra Milena, Marentes Diana, Correa Eliana María y Vargas Sandra. (2003). "Algunos estudios de alelopatía de *Rumex crispus* L. y *Polygonum segetum* HBK., en Colombia." *Corpoica* 4(1): 42-48.
 34. González, Y., M. Peña and R. Sánchez (2001). "Taninos de Diferentes Especies Vegetales en la Prevención del Fotoenvejecimiento." *Rev Cubana Invest Biomed* 20(1): 16-20.
 35. Guisaza. (2001). Plantas alelopáticas. Recuperado en: <http://www.webcolombia.com /alelopatia>
 36. Henley, E. y Seader, J., "Operaciones de Separación por Etapas de Equilibrio en Ingeniería Química". Editorial Reverte, México, 2000.
 37. Hernandez, M., L. García and D. Rojo (2003). "Alemendro de la India: Potencial Biológico Valioso." *Rev. Cubana Invest. Biomed* 22(1): 15 - <http://www.faiunne.edu.ar/biología/alelopatía/alelopatía.html>
 38. Hyodo, H. and Yang, S.F. (1991). Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. *Plant Physiology* 47: 765-770.
 39. John, J, Patil, R.H., Joy M. and Nair A.M. (2006). "Methodology of Allelopathy Research: 1. Agroforestry systems" *Allelopathy Journal*" 8(2): 173-214
 40. Jova Sáez Danelis. (2006). Efecto alelopático inducido por diferentes fracciones procedentes del extraxto acuoso de orozuz (*Phyla strigulosa* (Mart & Gal.). Mold sobre la germinación de maíz. Tesis de Diploma. Facultad de Química y Farmacia. Santa Clara, Cuba.

41. Kacperska, A. (1995) the phytohormone involvement in plant responses to environmental stress factors. *Kosmos* 11: 62637.
42. 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.
43. Lieberman, M. (1979). Biosynthesis and action of ethylene. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 533- 591.
44. 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.
45. Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
46. Olofsdotter, M. and Mallik, A.U. (2001). Allelopathy Symposium. *Agronomy Journal*. 93 (1): 1-2.
47. Osorio, G. (2006). "Evaluación de Hongos Endofíticos y Extractos Botánicos para el Control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morlet.) en Banano." CATIE Visitado 23 de marzo, 2007, Dirección Electrónica: http://www.catie.com/fitopatologia/Mycosphaerella_06/pdf_380938.htm
48. Otero, M. J. and L. G. Hidalgo. (2004). "Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales." *Livestock Research for Rural Development* Visitado 12 de abril 2007, Dirección Electrónica: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/2/oter1602.htm>
49. Pazmiño, A. (1999). Universidad de Chile, Escuela de Agronomía y Fisiología Vegetal.
50. Peterson, J.K., Harrison, H.F. and Snook, M.E. (2002). Bioassay guided isolation of seed germination inhibitors from sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. Cv. Regal] cortex tissue. *Allelopathy Journal*, 9 (2): 177-186p.

51. 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.
52. 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.
53. Politycka, B. and Wojcik-Wojtkowiak, D. (1994a). phenolics compounds in greenhouse substrates growing crops of cucumber. *Buletyn Warzywnicz* 41: 39-48.
54. 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.
55. Politycka, B., Kozłowska, M and Mielcarz, B (2004). Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. "Allelopathy Journal" 13(1): 29 - 36.
56. 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.
57. Reigosa, M. J., Pedrol, Nuria, Sánchez-Moreiras, A.M. and González, L. (2002). En *Allelopathy: From Molecules to Ecosystems*. . New Hampshire / U.S.A Science Publishers, Inc. España
58. Rosabal, Vega, J.; Puyans Garcell, L., "Hidrodinámica y separación mecánica", Tomo I, 296, Cuba, 1988.
59. Rukhsan, B. and I. Naz (2005). "Allelopathic Effects of *Eucalyptus citrodora* on Growth Nodulation and Arbuscular Micorizae Colonization of *Vigna radiata* (L) Wilczek." *Allelopathy Journal* 15(2): 273 - 245.
60. Sampietro, D. A. (2001). Alelopatía: Conceptos, Características, Metodología de Estudio e Importancia. [en línea]. Recuperado en: <http://www.faiunne.edu.ar/biología/alelopatía/alelopatía.html> [11/7/2007].
61. 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.
62. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
63. 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*.
64. Sullivan T J y Esptein A.C. (1984). Application of ultrafiltration in biotechnology. *Chemical Engineering Progress*. U.S.A, pp 68 - 75.
65. Swain, E., C. Li, and J. Poulton. (1992). Development of the potential for cyanogenesis in maturing black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.)
66. 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.
67. Theoreleyre Marc-Andre. Membranes Technology in the sugar industry. *International Sugar Journal*. USA. April 1996, pp 179-182, 142-195.
68. Torres, S., Puente, M., De Cupere, F., Puerto, M.G. y Rodríguez, M. (2003). Efecto alelopático del Boniato (*Ipomoea batata* Lam.) sobre la germinación y crecimiento de cultivos y malezas. "Centro Agrícola.", 30 (1): 59-63
69. Tretyn, A. (1994). Calcium ions transport trough eukaryotic membranes. I. calcium channels. *Postepy Biologii Komorki* 21: 319-340.
70. Volpin, H., Elkind., Okon,Y. (1994). A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) induces a defense in alfalfa roots. *Plant Physiology* 104: 683-689
71. Yang, S.F. and Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of Plant Physiology* 84: 596-602.
72. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555–559.