

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE EL EFECTO ALELOPATICO DE

Cupressus lusitanica Mill

Tesis para optar al Grado de  
Licenciada en Biología

NURIA LINES MOLINA

1977



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE EL EFECTO ALELOPATICO DE

Cupressus lusitanica Mill

Tesis para optar al Grado de  
Licenciada en Biología

NURIA LINES MOLINA

1977

Estudio preliminar sobre el efecto alelopático de

Cupressus lusitanica Mill.

Tesis presentada a la Escuela de Biología

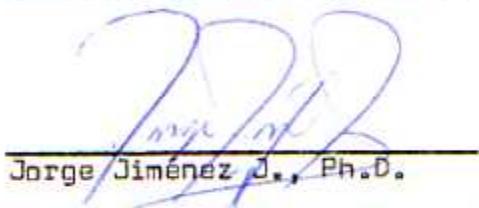
Universidad de Costa Rica

APROBADA:



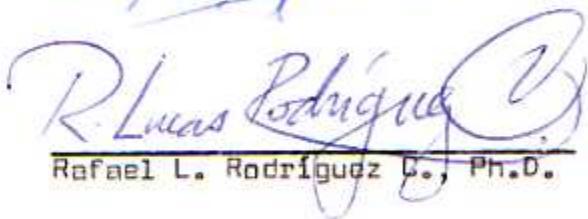
Luis A. Fournier D., Ph.D.

Director de Tesis



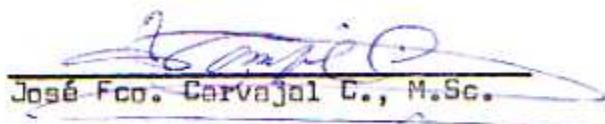
Jorge Jiménez J., Ph.D.

Miembro del Tribunal



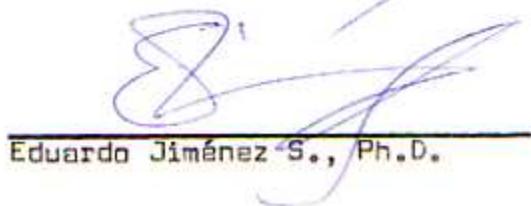
Rafael L. Rodríguez C., Ph.D.

Miembro del Tribunal



José Fco. Carvajal C., M.Sc.

Miembro del Tribunal



Eduardo Jiménez S., Ph.D.

Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todos mis profesores y compañeros de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

## AGRADECIMIENTO

Al Dr. Luis A. Fournier D., Director de Tesis quien con su acertada orientación y asistencia hizo posible la realización del presente trabajo.

Al Dr. Jorge Jiménez, al Dr. Rafael L. Rodríguez, al M.Sc. José Fco. Carvajal y al Dr. Eduardo Jiménez, por su valiosa colaboración en la corrección de la tesis.

Hago extensivo el agradecimiento a la M.Sc. María Isabel Morales por su inapreciable ayuda.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
Historia.....	4
El fenómeno.....	5
Mecanismos.....	9
Naturaleza química de los inhibidores.....	11
Algunos ejemplos de alelopatía.....	11
Importancia.....	13
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
Pruebas de alelopatía sobre semillas de hierbas con extractos acuosos de hoja de ciprés.....	16
Pruebas de alelopatía sobre semillas de hierbas con extractos acuosos de partes vegetativas y reproductivas de ciprés.....	17
Pruebas de alelopatía sobre plantas de <u>Lepidium</u> sp. en placas de Petri y sobre mantillo de hier bas en germinadores.....	18
Pruebas de alelopatía sobre semillas de ciprés con extractos de hoja de ciprés.....	19
Pruebas de alelopatía sobre semillas de hierbas en contacto con suelo de bosque de ciprés.....	19
Pruebas de alelopatía sobre plantas de frijol....	19
4. RESULTADOS.....	21

	<u>Página</u>
5. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	37
6. RESUMEN.....	43
7. LITERATURA CITADA.....	44

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro NO</u>		<u>Página</u>
1	Efecto de las emulsiones sobre el crecimiento de mantillo de hierbas y plantas de frijol .....	23
2	Efecto de las ramas de ciprés sobre el crecimiento de plantas de frijol en cama húmeda.....	24

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura Nº:</u>		<u>Página</u>
1	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. en diferentes extractos acuosos de hojas de ciprés. Mayo 1975.....	25
2	Germinación de semillas de <u>Rumex</u> sp. en diferentes extractos acuosos de hojas de ciprés. Mayo 1975. ....	26
3	Germinación de semillas de <u>Bidena</u> sp. en diferentes extractos acuosos de hoja de ciprés. Agosto 1976.....	27
4	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. en extractos acuosos de partes vegetativas de ciprés. Febrero-Marzo 1976.....	28
5	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. en extractos acuosos de partes reproductivas de ciprés. Febrero-Marzo 1976.....	29
6	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. en extractos acuosos de partes vegetativas de ciprés. Julio 1976.....	30
7	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. en extractos acuosos de partes reproductivas de ciprés. Julio 1976.....	31
8	Germinación de semillas de <u>Bidens</u> sp. en extractos acuosos de partes vegetativas de ciprés. Agosto 1976.....	32
9	Germinación de semillas de <u>Bidens</u> sp. en extractos acuosos de partes reproductivas de ciprés. Agosto 1976.....	33
10	Germinación de semillas de ciprés en diferentes extractos acuosos de hoja de ciprés. Setiembre 1976.....	34
11	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. y <u>Bidens</u> sp. en contacto con suelo de ciprés. Setiembre 1976.....	35
12	Germinación de semillas de <u>Lepidium</u> sp. en presencia de extracto de aceites esenciales de ciprés. Julio 1976.....	36

## INTRODUCCION

Un buen número de los compuestos biológicamente activos producidos por las plantas y liberados al medio ambiente natural, toman parte en múltiples procesos fisiológicos. Estos compuestos actúan sobre los animales como atrayentes o repelentes, o bien les sirven de alimento o les son tóxicos. Dichas sustancias también pueden estimular o inhibir el crecimiento de microorganismos. En el caso de plantas superiores intervienen en los procesos reguladores de la germinación, crecimiento y desarrollo (13, 23, 35, 36). Los compuestos de origen vegetal que actúan como inhibidores de la germinación y el crecimiento de plantas de la misma o de diferente especie, han sido denominados sustancias alelopáticas y la acción inhibidora se la denomina alelopatía (4).

Se considera a la alelopatía como la principal causante de la inhibición y a los factores ambientales (humedad, luz, tipo de suelo, temperatura, nutrimentos minerales, etc.) como secundarios, si se mantienen constantes. En el medio ambiente natural lo que se presenta es una participación conjunta de todos los factores de inhibición y de estímulo, dando como resultado una germinación y crecimiento netos (12, 37).

Las sustancias inhibidoras se han encontrado en un gran número de especies en casi todas las familias de plantas. En algunas de estas especies productoras de inhibidores se ha determinado el sitio de síntesis y de almacenamiento del principio activo. En las especies sobre las cuales uno o varios inhibidores ejercen su efecto se conocen ciertos detalles del mecanismo de acción que conducen al desequilibrio celular. El estudio químico de las sustancias alelopáticas ha establecido grupos de compuestos responsables de inhibición, entre ellos los más importantes son: terpenos, fenoles, ácidos orgánicos y alcaloides. Por otra parte, se ha señalado que el estado físico del compuesto determina la ruta de liberación y la forma de trasladarse hasta la planta receptora (3, 7, 36, 37).

En una comunidad, la dominancia de una especie está condicionada hasta cierto punto por su acción en la química del suelo. Las sustancias alelopáticas tienen efectos muy significativos en las comunidades actuando sobre la distribución de las especies y la sucesión (34).

La investigación sobre el fenómeno alelopático ha sido realizada en forma interrumpida y la mayor parte de los estudios analizan casos muy específicos. Sin embargo, el conjunto de observaciones y experiencias muestra que éste es un fenómeno biológico universal. La razón por la cual la alelopatía no es reconocida como tal, se debe a que los efectos alelopáticos no son siempre muy evidentes en una

comunidad compleja debido a los múltiples sucesos que allí ocurren y a que son difícilmente detectables. Algunos autores inclusive consideran las sustancias alelopáticas como productos de desecho del metabolismo liberadas al medio ambiente y sin efecto alguno sobre las plantas circundantes (4, 7, 15).

En este trabajo se estudió el efecto alelopático del ciprés Cupressus lusitanica Mill. sobre algunas especies de hierbas en condiciones de laboratorio.

## REVISION DE LITERATURA

### Historie:

Los estudios de alelopatía desde su inicio se han relacionado con el problema de "suelos enfermos", como denominan varios autores al efecto de este factor (4, 21). Este análisis histórico del tema se basa principalmente en la revisión realizada por Garb (10). Según ese autor, en 1832 De Candolle fue el primero en interrogarse acerca de la existencia de los inhibidores con base en observaciones de campo. Liebig a finales del Siglo XIX, descartó la posibilidad de los inhibidores como responsables de la competencia vegetal y explicó el fenómeno con base en las diferentes necesidades de las plantas por los elementos menores. Su opinión hizo que la atención puesta en los inhibidores se desviara a temas de nutrición vegetal. En 1909 Schreiner revivió de nuevo la interrogante de los inhibidores por medio de sus estudios sobre suelos infértiles. Ese investigador informó de una serie de sustancias que encontró en el suelo con propiedades inhibitorias. En ese momento se sobreestimó la importancia del fenómeno y se tomó como solución a los problemas generales de competencia. El término alelopatía fue utilizado por primera vez en 1937 por Molisch y deriva del griego: alelo, a la par y pathos, enfermedad. Casi al mismo tiempo, Loehwing (15) concluyó en una revisión, que la existencia de los inhibidores no había sido comprobada ni tampoco su relación con los "suelos enfermos". Después de esta época el estudio de este fenómeno decayó durante un período extenso.

Bonner (3) en 1950 hizo una revisión del tema y aportó nuevas pruebas para considerar estos factores como inhibidores biológicos. Posteriormente Garb (10) y Evenari (7) analizaron el tema en forma detallada. En 1970 aparecieron dos nuevas revisiones sobre alelopatía, las de Wittaker (37) y Went (35).

El tema ofrece muchas posibilidades de investigación y estudio, pero son muchos los investigadores escépticos en cuanto a la importancia de los factores alelopáticos. En la actualidad se trabaja en algunos laboratorios con muy diferentes métodos, especies y fines, y siempre en forma aislada.

#### El fenómeno:

La producción de sustancias alelopáticas permite a las plantas competir favorablemente en las comunidades vegetales y numerosas investigaciones han demostrado que la dominancia de una especie sobre otra se debe no sólo a competencia por humedad, espacio radical, nutrimentos, luz, etc., sino que además por sustancias liberadas por una planta con efecto inhibitorio sobre las plantas vecinas (3, 4, 7, 10, 13, 14, 35). Las plantas, lejos de ser pasivas y productoras de alimento sin desperdicios, son agresivas con esta serie de sustancias alelopáticas que les permiten asegurar su puesto en la comunidad (37).

Los inhibidores pueden clasificarse en: a) inhibidores de germinación, los que actúan inhibiendo parcial o totalmente la germinación y b) inhibidores de crecimiento, los que retardan o inhiben el crecimiento de una planta ya formada. En los diferentes estados de desarrollo las plantas son sensibles a los inhibidores y la distinción en la denominación radica en la etapa del desarrollo en que se encuentra el organismo en ese momento (7). Cuando la acción del inhibidor se manifiesta sobre plantas de otra especie, aquél se denomina heterólogo y cuando actúa sobre la misma especie es homólogo o autotóxico (10).

Una misma planta o semilla reaccionan de diferente manera ante inhibidores procedentes de diversas fuentes. Hay inhibidores con una muy marcada especificidad que actúan solamente sobre una especie o sobre una familia. Por otra parte, hay inhibidores con un amplio espectro de acción y, por lo tanto, tienen gran actividad e importancia. Esto hace suponer que algunos inhibidores son en realidad una mezcla de sustancias con actividad alelopática. La magnitud de la respuesta ante la presencia de un inhibidor o de una mezcla de ellos va a depender de la receptividad que tenga la planta por ese determinado grupo de compuestos químicos (14, 26, 35).

En general las sustancias presentes en las plantas se pueden clasificar de la siguiente manera: primarias (proteínas, ácidos nucleí

cos, clorofila y polisacáridos); secundarias (compuestas de peso molecular variable, estructura generalmente compleja y que no están involucrados en el metabolismo básico de la célula) y misceláneas (iones) (8). De acuerdo con esta clasificación los inhibidores pertenecen al grupo de los compuestos secundarios, los cuales combinados de diferentes maneras pueden tener efecto alelopático (37). Las diferentes concentraciones durante el transcurso de un año tienen vital importancia en la manifestación del fenómeno. Se ha observado que los inhibidores dependiendo de la concentración, inhiben o estimulan. Esto podría explicarse por dos razones: a) que los inhibidores actúan como las hormonas, venenos y ciertas drogas, las que en altas concentraciones inhiben y en bajas estimulan; b) que la inhibición y la estimulación sean causadas por diferentes sustancias, las cuales se encuentran presentes en altas concentraciones en distintas épocas del año. Estas razones parecen ser válidas para diversos casos de plantas y de propiedades químicas del inhibidor (7).

La ruta de liberación de las sustancias alelopáticas depende de sus propiedades físicas, del sitio de acumulación del inhibidor y del clima (34, 38). Los inhibidores en estado gaseoso difunden a través del aire hasta la planta que los recibe o van directamente al suelo. La volatilización desde las hojas es el mecanismo de liberación de las sustancias alelopáticas aromáticas (2, 20). Los

líquidos salen a la superficie de la planta con el vapor de agua y la gutación. Estas sustancias son lavadas por la lluvia desde las hojas, frutos, corteza, etc.; la niebla y el rocío pueden trasladarlas también al suelo (19). Estas sustancias alelopáticas que son lavadas del follaje arrastran una serie de nutrimentos los cuales son reabsorbidos por las raíces de la planta. Se ha demostrado que cuanto mayor es el lavado mayor es la reabsorción por las raíces, hasta recuperar los niveles normales de los nutrimentos perdidos (18, 31, 32). Cuando el principio activo se libera por las raíces puede formar parte de los exudados de éstas o de la materia en descomposición (3, 4). Hay bastante evidencia de que las plantas en condiciones normales liberan exudados fitotóxicos que influyen en la rotación de cultivos. La cantidad de nutrimentos que toma una planta del suelo es muy poca para asegurar que a esto se deben los problemas en la rotación de cultivos, sino que más bien por la presencia de sustancias liberadas por el cultivo anterior capaces de inhibir la germinación o el crecimiento del siguiente cultivo (11, 38). Algunas de las sustancias liberadas por órganos en descomposición tienen la característica especial de inhibir indirectamente. Es decir, son inhibidores de la germinación y crecimiento por transformaciones que producen en las bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes. Las plantas que no pueden sobrevivir en zonas de baja concentración de nitrógeno serán desplazadas por especies tolerantes que invaden la comunidad. Este efecto alelopático que se realiza a través de microorganismos se denomina indirecto. Se ha demos

trado que estos inhibidores, principalmente fenoles, actúan tanto sobre microorganismos como sobre algunas plantas superiores (9, 17, 27, 28, 29).

Generalmente los inhibidores se acumulan adsorbidos a las partículas coloidales del suelo o a las semillas. Durante la época seca el principio activo se absorbe a la cutina de las semillas que están en contacto directo con él o pasan a la raíz. La mayoría de los inhibidores son solubles en parafina, lo que sugiere una rápida combinación con la cutina. El tiempo de almacenamiento de los inhibidores puede ser de varios meses sin perder su poder alelopático (16, 19, 21, 24).

#### Mecanismos:

Los inhibidores alelopáticos se producen en diferentes partes de la planta de acuerdo a la especie y pueden estar confinados a una o varias estructuras dentro de la misma planta para su almacenamiento. Se encuentran en los frutos (cáscara, pulpa y jugo), en las semillas (cubierta y endospermo), en hojas y raíces. La producción de los inhibidores depende directamente del metabolismo celular e indirectamente del clima y de la etapa del ciclo de vida en que se encuentra la planta (3, 4, 10, 16).

Los inhibidores actúan sobre semillas o sobre raíces. En las semillas inhiben la división y agrandamiento celular, acumulan lípidos y en casos muy severos provocan diferenciación anormal de los tejidos. Se ha observado una acumulación muy grande de lípidos y depósitos de cutina en las paredes externas de las células de la epidermis de semillas en contacto con inhibidores (10, 24). Los inhibidores de crecimiento actúan en las raíces de plantas ya formadas y detienen el crecimiento disminuyendo la absorción de agua y electrolitos a través de ellas (22).

Se han propuesto dos teorías que tratan de explicar el fenómeno alelopático a nivel celular. La primera de ellas considera que las sustancias inhibitoras actúan directamente sobre la membrana celular interrumpiendo el equilibrio al variar los niveles normales de agua y de electrolitos. En consecuencia ocurre una modificación del potencial osmótico celular que es causa parcial de la inhibición, lo mismo que una variación del pH. Un efecto combinado de la alteración de ambos parámetros puede explicar en parte el fenómeno (7). La otra teoría se basa en la idea de que los inhibidores son destructores o inactivadores químicos de la actividad celular, y en que las sustancias alelopáticas actúan como antagonistas o destructores de las hormonas vegetales como auxinas, gibberelinas y citoquininas. La acción de los inhibidores alelopáticos se puede considerar similar a la del ácido abscísico, inhibidor intrín-

seco de las plantas. Las sustancias alelopáticas en general se pueden considerar como factores que mantienen a las fitohormonas en niveles bajos. Hay además algunas otras pruebas que sugieren una depresión no específica del metabolismo a través del bloqueo de la síntesis del ATP por la acción de los inhibidores fenólicos que afectan negativamente todos los procesos celulares (12, 30).

#### Naturaleza química de los inhibidores:

Los inhibidores no presentan similitud química en su estructura y la mayoría son compuestos orgánicos (4, 7). Entre los más comunes están:

Acido cianhídrico	Aceites de mostaza	Alcaloides
Amoniaco	Acidos orgánicos	Fenoles
Terpenos	Lactonas insaturadas	Azúcares

#### Algunos ejemplos de alelopatía:

El combate natural de hierbas por competencia se reduce a unos pocos ejemplos de alelopatía. Con variedades de pepino de 41 países creciendo junto con dos especies de hierbas como indicadores, se comprobó el efecto de las sustancias alelopáticas. De algunas variedades de pepino se obtenían lavados tóxicos que aplicados a germinadores con sólo hierbas, producían un marcado efecto inhibitorio de crecimiento (26).

La inhibición por sustancias volátiles producidas por Salvia leucophylla ha sido ampliamente estudiada en el campo y en invernaderos. La atmósfera alrededor de Salvia sp. se ha estudiado por cromatografía de gases y se ha encontrado que contiene dos terpenos principalmente: cineol y alcanfor. Estos terpenos que aparecen en las plantas se consideran los más tóxicos desde el punto de vista inhibitorio. El hecho de ser muy solubles en parafina sugiere que se disuelven fácilmente en la cutina de las semillas. En suelos de bajo contenido de humedad los terpenos se adsorben a las partículas coloidales manteniéndose la toxicidad durante varios meses. En estas condiciones, cuando las semillas de otras especies inician la germinación, ocurren las modificaciones siguientes: reducción del crecimiento de la radícula y del hipocótilo, inhibición de la división y la elongación celular; acumulación de lípidos y formación de depósitos de cutina. Las sustancias aromáticas liberadas por Salvia sp. determinan el patrón de distribución de las especies de hierbas en la zona semiárida del "chaparral". Se ha observado que hay una interacción y sinergismo entre las sustancias alelopáticas y los factores de clima, espacio, niveles de nutrientes, etc., lo que produce una distribución muy típica en forma de parches (20, 21, 24).

En muchas especies se ha estudiado la inhibición por parte de los ácidos fenólicos como un ejemplo de alelopatía. La presencia

de estas sustancias se demostró por cromatografía de papel en más de 20 frutos secos de especies diferentes. Los principales inhibidores identificados son derivados de los ácidos benzoico y cinámico. Estas sustancias inhibitoras son solubles en agua y en éter, y se encuentran en diferentes proporciones y combinaciones en cada especie. La mayor parte de los inhibidores son eliminados de los frutos por el agua de lluvia y la velocidad del lavado depende de la estructura del pericarpo. Se ha demostrado también que el almacenamiento de frutos secos no afecta la cantidad ni las características del inhibidor (33).

#### Importancia:

Las sustancias alelopáticas tienen efectos sobre la distribución de las especies en la comunidad y la sucesión. Las especies incapaces de sobrevivir en presencia de determinadas sustancias alelopáticas no aparecen en la comunidad. La alelopatía interviene en estas relaciones dando lugar a una comunidad con un bajo nivel de diversidad si se encuentra presente una especie dominante. En aquellas comunidades con varias especies dominantes, los inhibidores promueven la formación de comunidades mixtas. Por otra parte la presencia de autotoxicidad da lugar a la formación de comunidades mixtas además de diferencias en el crecimiento de los individuos de una misma especie. Aquellos individuos localizados en el interior de un rodal muestran menor vigor. La gran variedad de espe

cies que presenta el bosque tropical húmedo se debe en cierta parte a la autotoxicidad de muchas de sus especies. La planta inhibe la germinación de sus propias semillas y le cede el espacio a otra especie (34).

La secuencia de sucesión es alterada por las sustancias alelopáticas en diferentes formas: A) represión de una especie por otra, B) autotoxicidad, C) represión indirecta de una especie por otra a través de la inhibición de bacterias fijadoras de nitrógeno y nitrificantes. Con alguna de estas formas o con una combinación de ellas se logra retardar o acelerar la secuencia de sucesión de una comunidad vegetal. Conociendo las posibilidades alelopáticas de una especie, se puede determinar su éxito de invasión a una comunidad. Después de las quemadas se observa una composición poco variada, la cual luego se sustituye por parches de diversas especies. Este efecto se debe a que el calor del fuego desnaturaliza las sustancias alelopáticas acumuladas en el suelo y a que sólo sobreviven las semillas resistentes al fuego. Estas semillas dan lugar a parches dominantes los cuales luego van a ser sustituidos por especies alelopáticamente más activas. Todos estos fenómenos son también observables en los lugares donde se forman las asociaciones secundarias después de la "chapea" y "vuelco" de montaña (1, 6, 14, 36).

## MATERIALES Y METODOS

Esta investigación fue realizada en los laboratorios e invernaderos de la Escuela de Biología en la Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" de la Universidad de Costa Rica.

El material empleado como fuente de sustancias inhibidoras fue el ciprés Cupressus lusitanica Mill., procedente de un bosque de 25 años de edad y a una altitud de 1750 metros.

Las diferentes partes vegetativas y reproductivas del ciprés fueron sometidas a una extracción acuosa sin agitación durante 24 horas en un frasco sellado con papel de parafina y a temperatura ambiente. Los extractos acuosos obtenidos fueron filtrados y luego guardados en un recipiente sellado y protegido de la luz.

Por otra parte se hicieron extracciones acuosas del mismo material macerado previamente durante 5 minutos. Luego de extraído durante 24 horas en las mismas condiciones a las descritas en el caso anterior, se obtuvieron extractos verdes de aspecto lechoso.

Además de estas extracciones con agua se realizó una destilación por arrastre con vapor, logrando aislar los aceites esenciales de la hoja de ciprés.

Como indicadores de inhibición se emplearon semillas de tres especies de hierbas comunes del Valle Central, que son: Lepidium costaricensis (mastuerzo), Bidens pilosa (moriseco) y Rumex crispus (ruibarbo).

En las experiencias en que se utilizaron los extractos acuosos, se colocó las semillas de las hierbas sobre papel de filtro en placas de Petri y se les agregó 2 ml de agua o del extracto cada dos o tres días dependiendo de la evaporación. Las placas permanecieron expuestas sobre una mesa al fotoperíodo natural. Además en cada caso se pusieron placas de los distintos tratamientos en la oscuridad.

En las pruebas que se realizaron con el extracto de aceites esenciales de la hoja de ciprés en placas de Petri, se hizo una sola aplicación de una gota del extracto. También se utilizó este extracto en pruebas en germinadores en los cuales se dejaba crecer el montillo natural de hierbas o plantas de frijol. A las plantas en estos germinadores se les hizo una sola aplicación atomizando una vez con el extracto de aceites al cual se le agregó Triton X como fijador. Se regaba cada tres o cuatro días dependiendo de la necesidad de humedad.

A. Pruebas de alelopatía sobre semillas de hierbas con extractos acuosos de hoja de ciprés. Se colocó en cada placa 50 se -

millas de una de las especies. Cinco placas en total constituyen los tratamientos para cada especie, a saber:

<u>Tratamiento</u>	<u>Composición del extracto</u> (gramos de hoja de ciprés por litro agua)
Testigo	0
Nº 1.	100
Nº 2.	200
Nº 3.	300
Nº 4.	400

Los extractos fueron hechos de acuerdo con el método descrito anteriormente.

La prueba se realizó en el mes de mayo de 1975 con Lepidium sp. y con Rumex sp. y se repitió con Bidens sp. en agosto de 1976 con extractos de material previamente macerado.

B. Pruebas de alelopatía sobre semillas de hierbas con extractos acuosos de partes vegetativas y reproductivas de ciprés. Se colocó 25 semillas en cada placa y ocho placas en total constituyeron los tratamientos, a saber:

<u>Tratamiento:</u>	<u>Composición del extracto (300 g/l)</u>
Testigo	Agua destilada
NO 1.	Hojas
NO 2.	Ramas
NO 3.	Corteza
NO 4.	Conos femeninos inmaduros
NO 5.	Conos femeninos abiertos
NO 6.	Semillas
NO 7.	Raíz

Los extractos se obtuvieron según el método descrito. Esta prueba se realizó durante el mes de febrero de 1976 con Lepidium sp. y se repitió en el mes de julio de 1976 con Bidens sp.

C. Pruebas de alelopatía sobre plantas de Lepidium sp. en placas de Petri y sobre mantillo de hierbas en germinadores.

A 25 plantas de Lepidium sp. se les agregó una gota de extracto de aceites esenciales, obtenido según el método antes descrito.

Al mantillo de hierbas en los germinadores se les atomizó una vez con 0,5 ml de extracto de aceites esenciales, 0,5 ml de fijador y 333 ml de agua. El testigo se atomizó con igual cantidad de agua y de fijador.

Estas pruebas se realizaron en el mes de abril de 1976.

D. Pruebas de alelopatía sobre semillas de ciprés con extractos de hoja de ciprés. Se colocó 50 semillas de ciprés en cada placa y los tratamientos fueron los mismos que en el punto A. Los extractos se prepararon de acuerdo con el método usual. Esta prueba se realizó en el mes de setiembre de 1975 y se repitió con extractos de material previamente macerado en agosto de 1976.

E. Pruebas de alelopatía sobre semillas de hierbas en contacto con suelo de bosque de ciprés. En esta prueba se colocó el papel de filtro sobre una capa de suelo de bosque de ciprés y luego, encima de éste, las semillas. Se regó la tierra con agua a través de un agujero en el borde del papel. El testigo tenía tierra de suelo de bosque sin ciprés.

Esta prueba se realizó en el mes de mayo de 1975 con Lepidium sp. y se repitió con Bidens sp. en setiembre de 1976.

F. Pruebas de alelopatía sobre plantas de frijol. En plantas de frijol de quince días se aplicó en atomización una emulsión de los aceites esenciales de hoja de ciprés: 0,5 ml por 33 ml de agua. La extracción de los aceites se realizó según el método descrito anteriormente. En esta prueba se empleó tres repeticiones y se realizó en el mes de setiembre de 1976. También se hizo una

prueba en la cual plantas de frijol germinadas en recipientes individuales se pusieron en contacto con ramas de ciprés. Una bolsa de plástico transparente mantenía un ambiente de cámara cerrada capaz de evitar la salida de las sustancias volátiles y del vapor de agua. El testigo de esta prueba lo constituyó un modelo igual al descrito pero en este caso con Grevillea robusta. Esta planta fue escogida como testigo por tener una área foliar pequeña, la cual daría sombra en cantidad parecida al ciprés. Esta prueba se realizó durante el mes de agosto de 1976. En ambas pruebas se determinó después de doce días de iniciado el experimento: el peso seco de las hojas, ancho y largo de las hojas, peso de la raíz y se observó la apariencia general de las plantas.

## RESULTADOS

En las Figuras Nº 1, 2 y 3 se observa respectivamente, la variación en la germinación de Lepidium sp., Rumex sp., y Bidens sp. en presencia de diferentes concentraciones del complejo inhibidor extraído de hojas de ciprés. En los tres casos se puede notar un efecto marcado del inhibidor durante los primeros días, pero posteriormente se presenta una paulatina recuperación del poder germinativo de las semillas. Se aprecia también diferentes respuestas tanto entre las varias especies como en el efecto de las concentraciones del extracto.

Las Figuras Nº 4 y 5 presentan el efecto de los extractos de las partes vegetativas y reproductivas del ciprés en la estación seca, sobre semillas de Lepidium sp. Estos gráficos muestran que en ningún caso hubo efecto inhibidor, antes bien, hubo estímulo de la germinación por parte de los extractos de corteza y semillas, lo que fue comprobado mediante análisis de variancia.

Una prueba similar a la anterior se llevó a cabo durante la estación lluviosa con Lepidium sp. (Figuras Nº 6 y 7). Los resultados de esta experiencia muestran, según análisis de variancia, la presencia de los inhibidores en los extractos en esta época del año. Se determinó además, que los extractos de raíz no afectan la germinación; los extractos de hojas y ramas afectan moderadamente y los conos femeninos y semillas en un 100% en esta especie.

Las Figuras Nº 8 y 9 muestran un efecto inhibitor muy marcado de las estructuras reproductivas del ciprés sobre semillas de Bidens sp., en comparación con las partes vegetativas.

La Figura Nº 10 incluye los resultados de las pruebas de autotoxicidad, durante la estación lluviosa. No hay efecto aparente del ciprés sobre sus propias semillas, según lo demuestre el análisis de variancia de los resultados de esta prueba.

En las pruebas realizadas con suelo de bosque de ciprés, la germinación de las semillas de Lepidium sp. y Bidens sp. no se vio afectada por la posible presencia de inhibidores (Figura Nº11).

Los resultados de la prueba con extractos de aceites esenciales se incluyen en la Figura Nº 12.

El Cuadro Nº 1 muestra los resultados de peso húmedo del mantillo de hierbas y de plantas de frijol después de atomizadas con las emulsiones de los aceites esenciales del ciprés.

Los resultados de la prueba de crecimiento de frijol en cámaras húmedas muestran que no hubo efecto inhibitorio después de permanecer en contacto con ramas de ciprés. A pesar de que las determinaciones de peso y longitud no presentan diferencias respecto al

testigo, un buen número de las hojas en contacto con el ciprés tenían apariencia anormal (Cuadro NO 2).

CUADRO 1

Efecto de las emulsiones sobre el crecimiento  
de mantillo de hierbas y plantas de frijol

Tipo de Cobertura	Peso húmedo de la planta en gramos		
	Testigo	Fracción de aceites esenciales	Fracción acuosa
Mantillo de hierbas	31	32	29
Plantas de frijol	9,5	9,6	10,8

En las pruebas de germinación con los extractos acuosos y con aceites esenciales en la oscuridad, se observó que la germinación fue mayor que en los mismos tratamientos a la luz en un 30 ó 40%. Se muestra una inhibición del efecto inhibitorio por parte de la oscuridad.

El pH de los extractos acuosos por lo general mostró valores cercanos a 5,0.

CUADRO 2

Efecto de las ramas de ciprés sobre el crecimiento  
de plantas de frijol en cámara húmeda

	Frijol en contacto con ciprés	Frijol en contacto con <u>Grevillea robusta</u>
Peso total	41,8 g	43,3 g
Peso de las hojas	12,0 g	13,5 g
Peso de las raíces	7,0 g	6,1 g
Peso de los tallos	21,4 g	20,2 g
Longitud de las hojas	6,9 cm	7,1 cm
Ancho de las hojas	5,8 cm	6,2 cm
Apariencia de las hojas		
Normales	4	17
Anormales	28	11

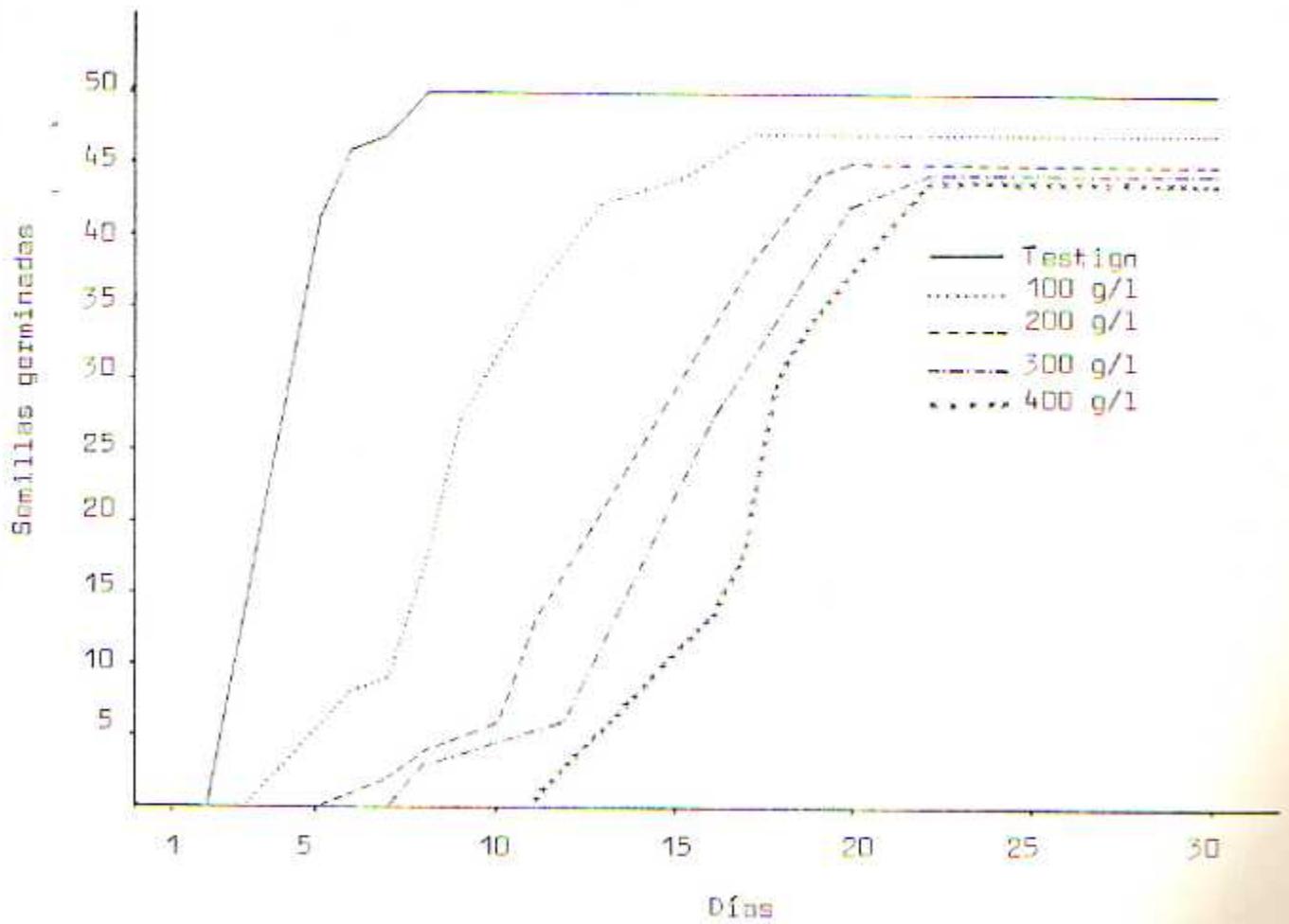


FIGURA 1. Germinación de semillas de Lepidium sp. en diferentes extractos acuosos de hojas de ciprés. Mayo 1975.

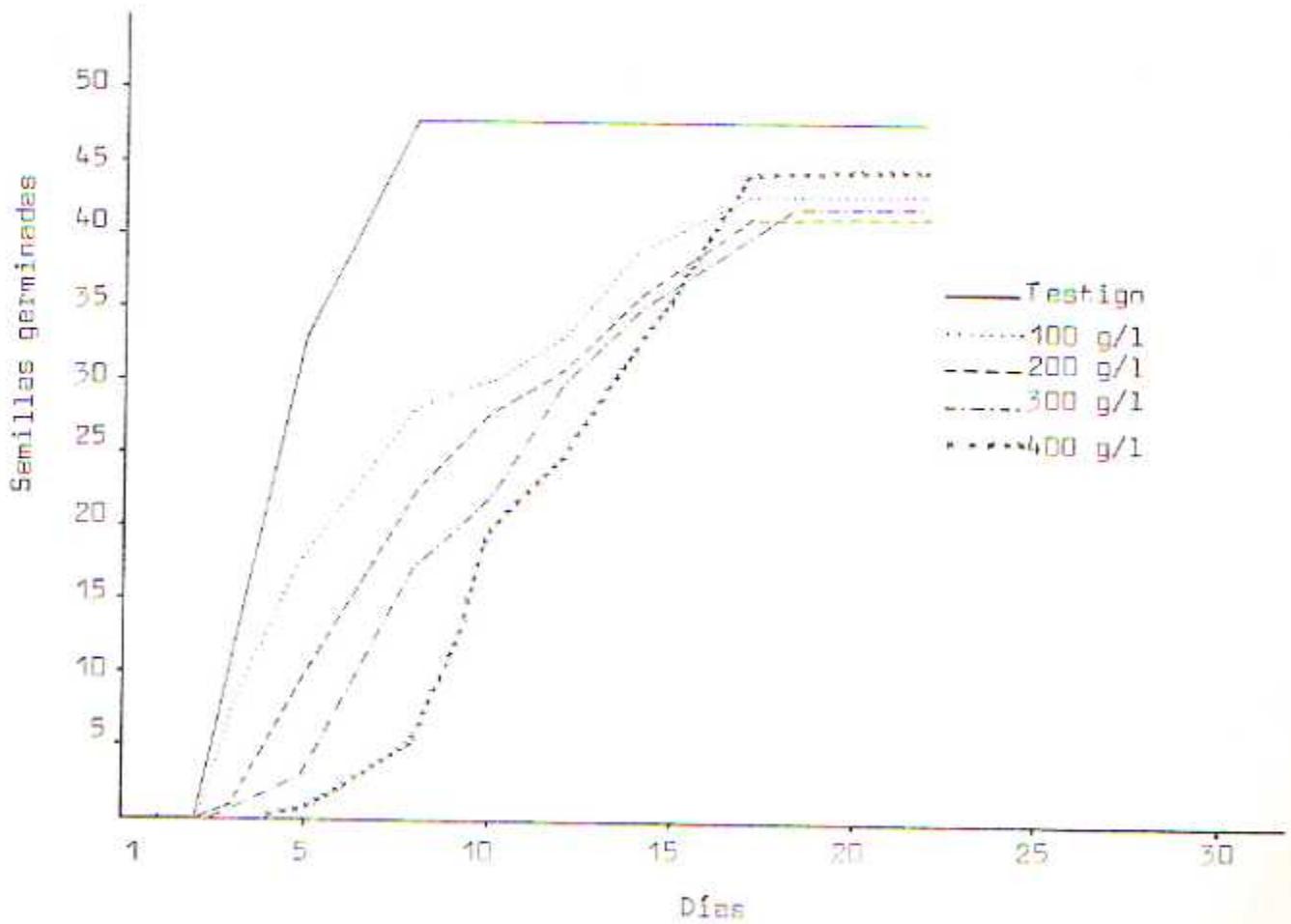


FIGURA 2. Germinación de semillas de Rumex sp. en diferentes extractos acuosos de hojas de cíprés. Mayo 1975.

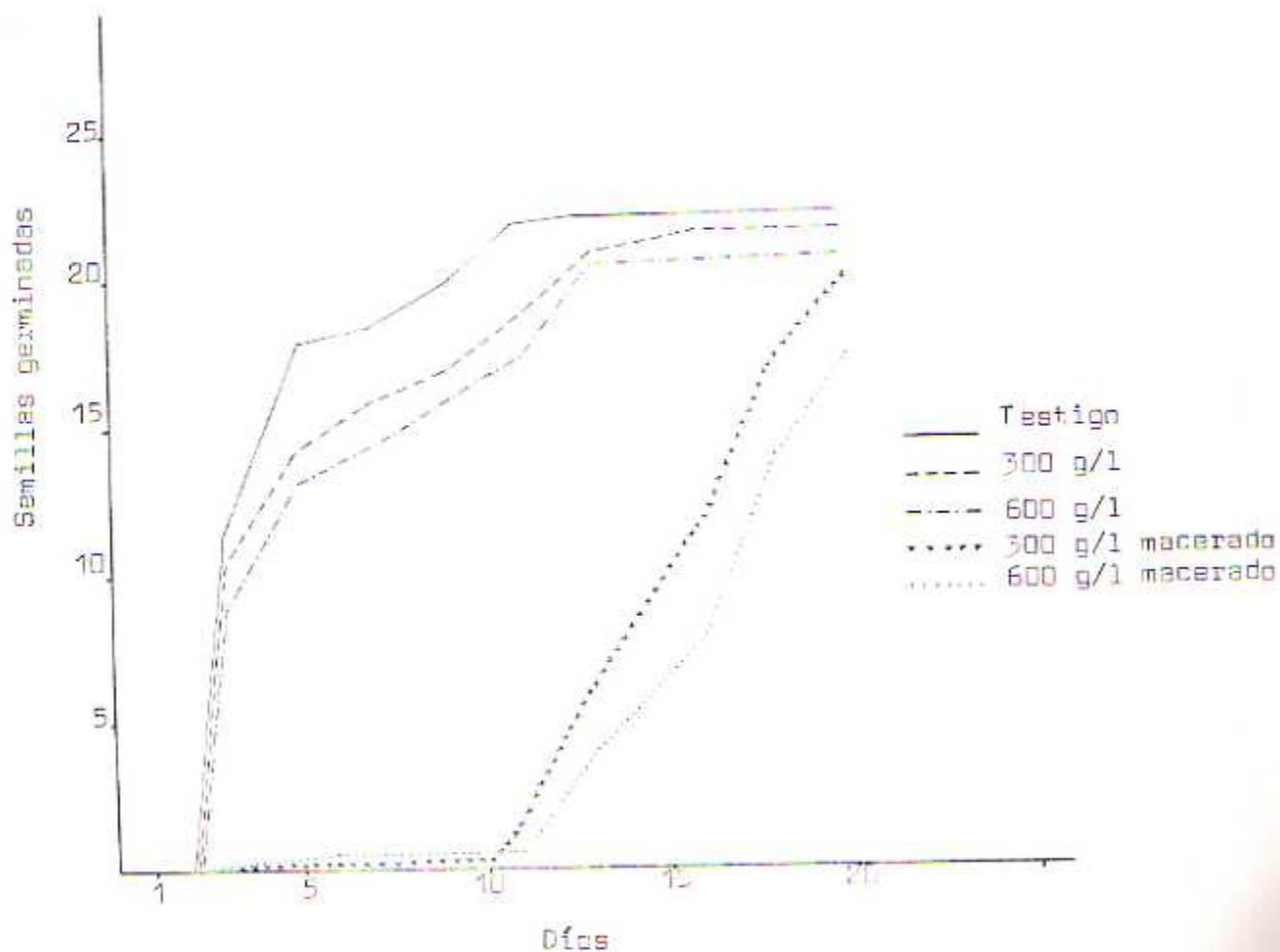


FIGURA 3. Germinación de semillas de *Bidens* sp. en diferentes extractos acuosos de hojas de ciprés. Agosto 1976.

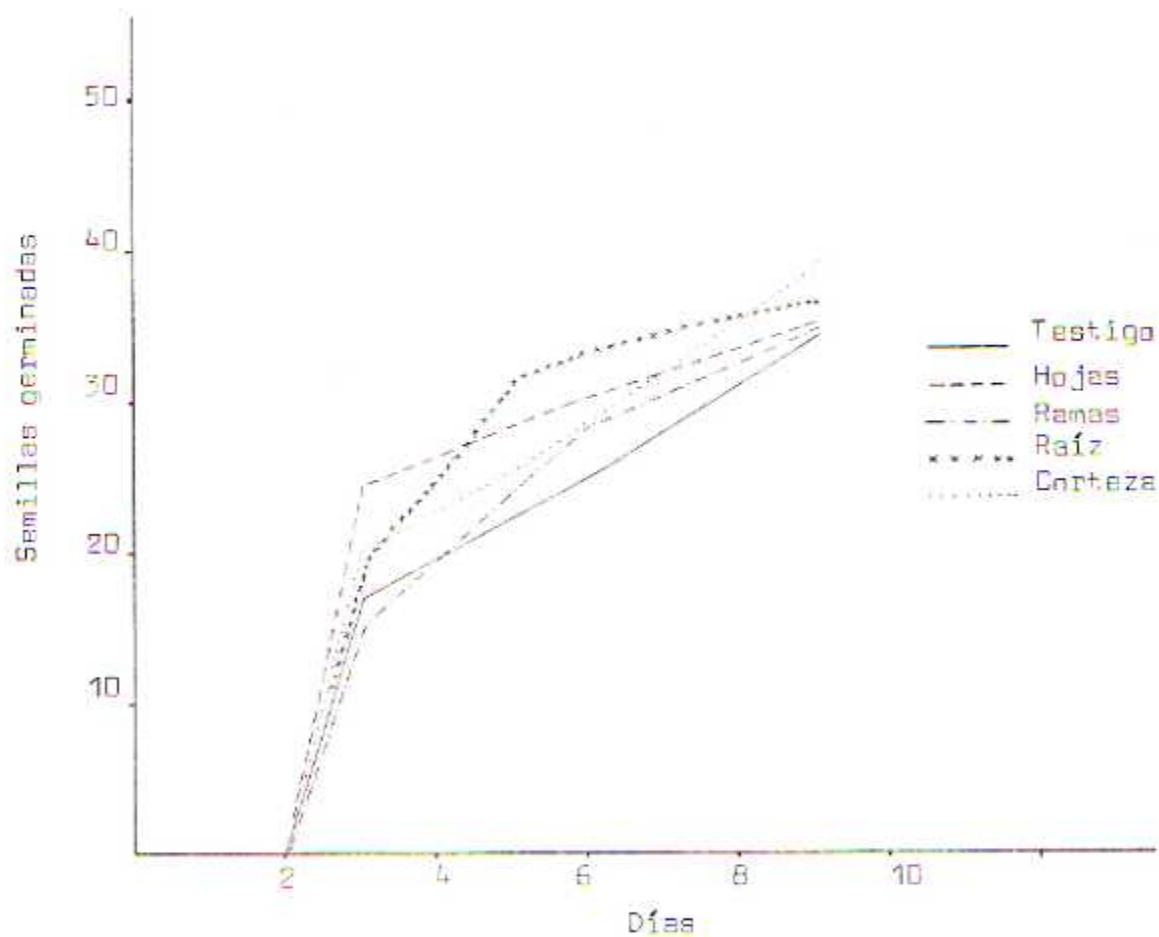


FIGURA 4. Germinación de semillas de Lepidium sp. en extractos acuosos de partes vegetativas de ciprés. Febrero-Marzo 1976.

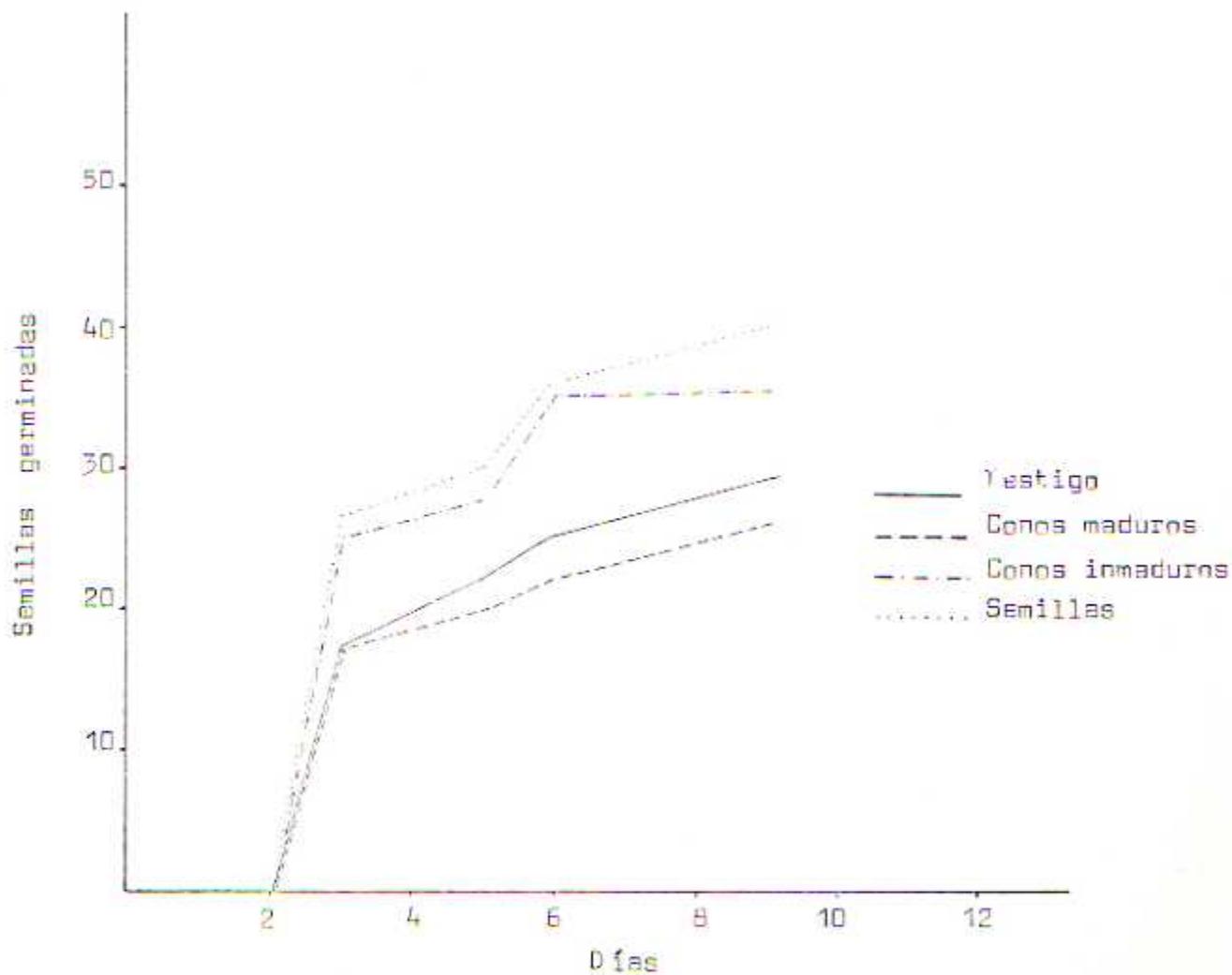


FIGURA 5. Germinación de semillas de *Lepidium* sp. en extractos acu-  
sos de partes reproductivas de ciprés. Febrero-Marzo 1976.

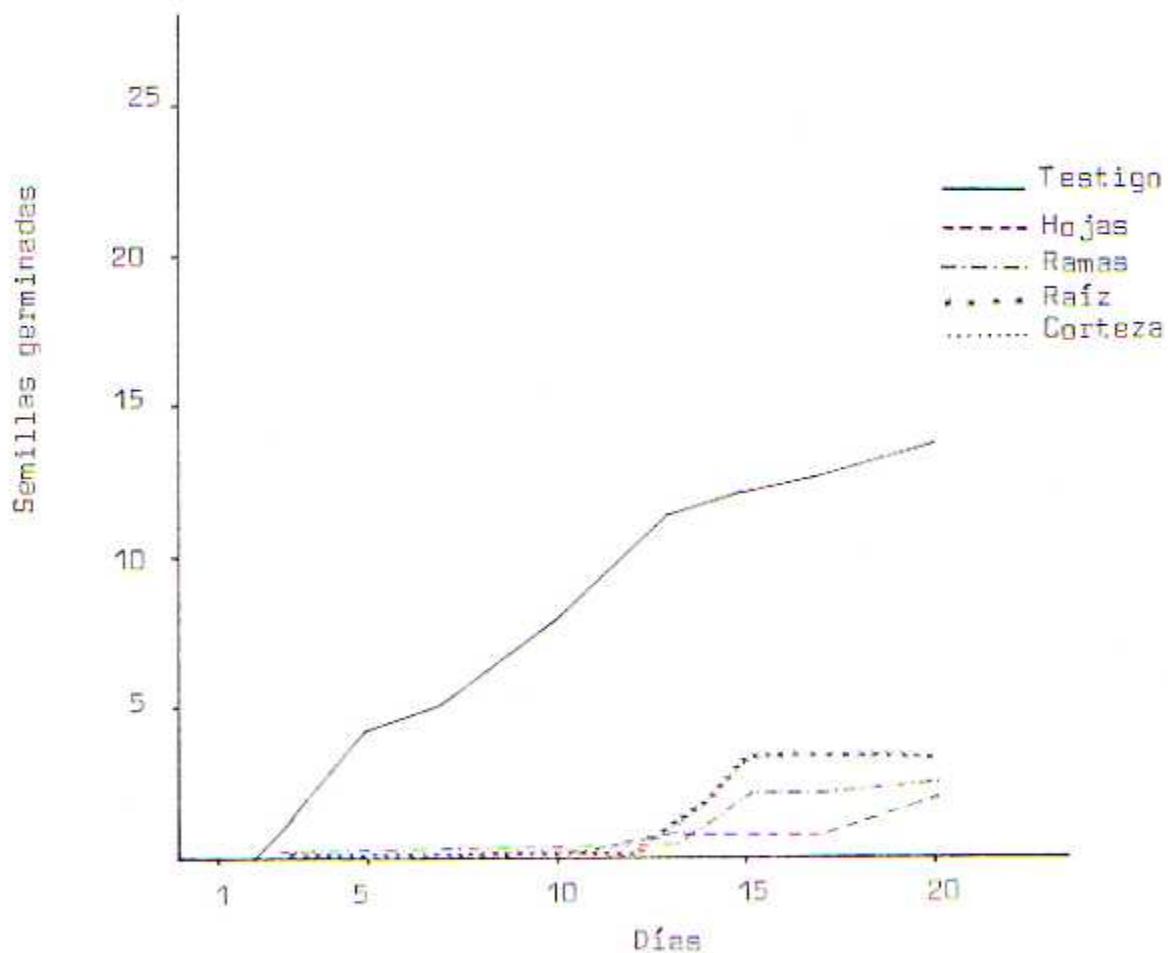


FIGURA 6. Germinación de semillas de *Lepidium* sp. en extractos acuosos de partes vegetativas de ciprés. Julio 1976.

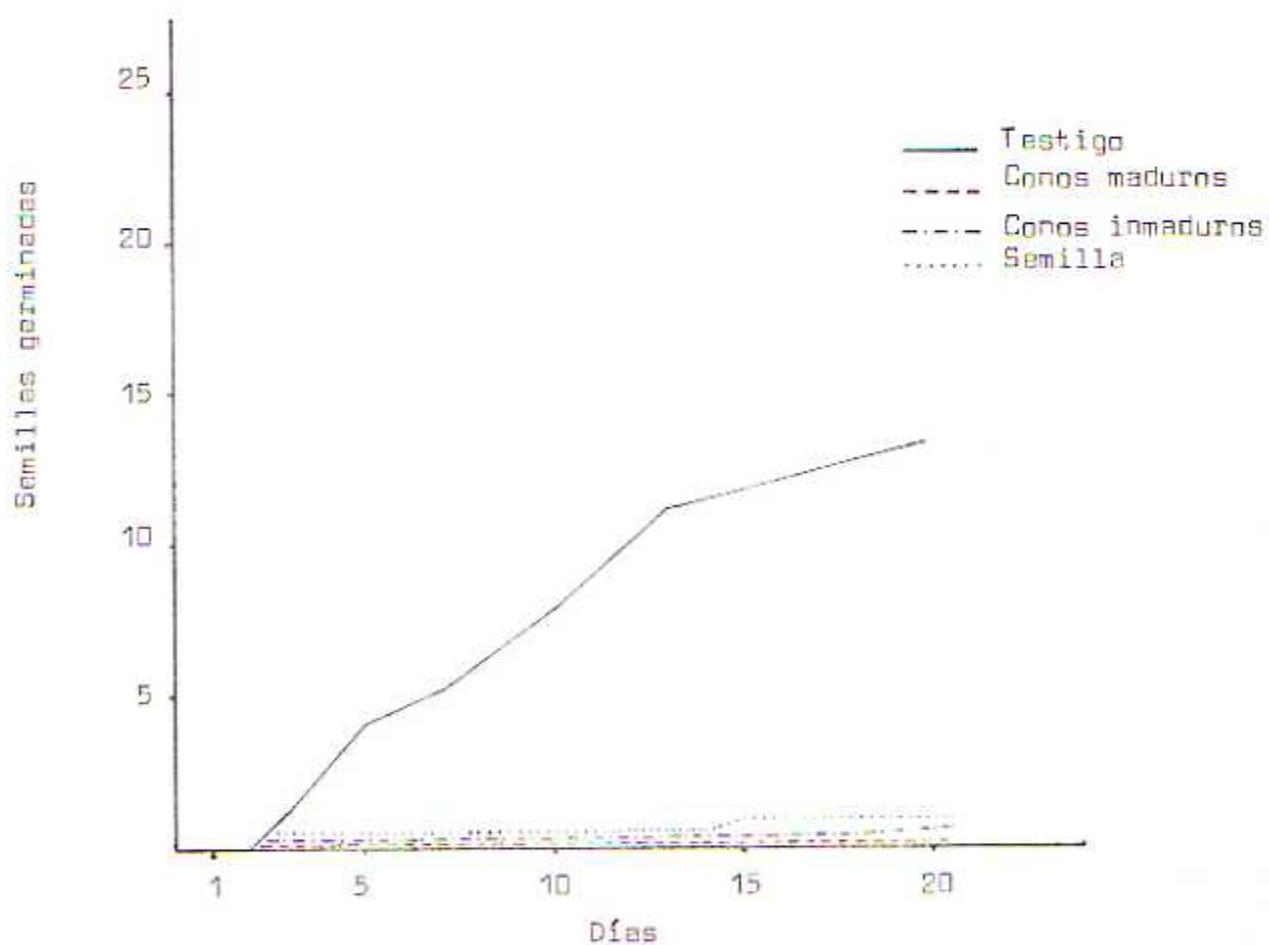


FIGURA 7. Germinación de semillas de Lepidium sp. en extractos acuosos de partes reproductivas de ciprés. Julio 1976.

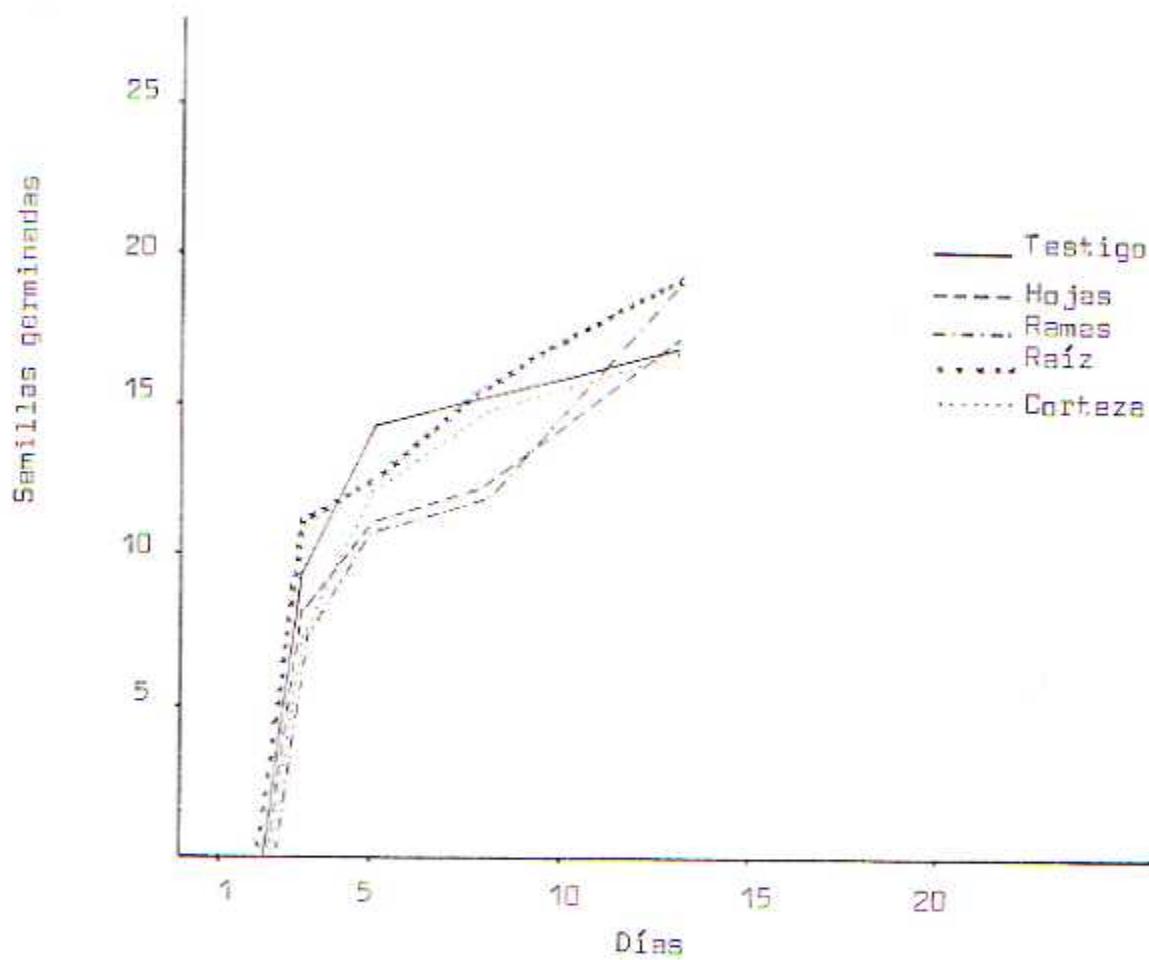


FIGURA 8. Germinación de semillas de *Bidens* sp. en extractos acuosos de partes vegetativas de ciprés. Agosto - 1976.

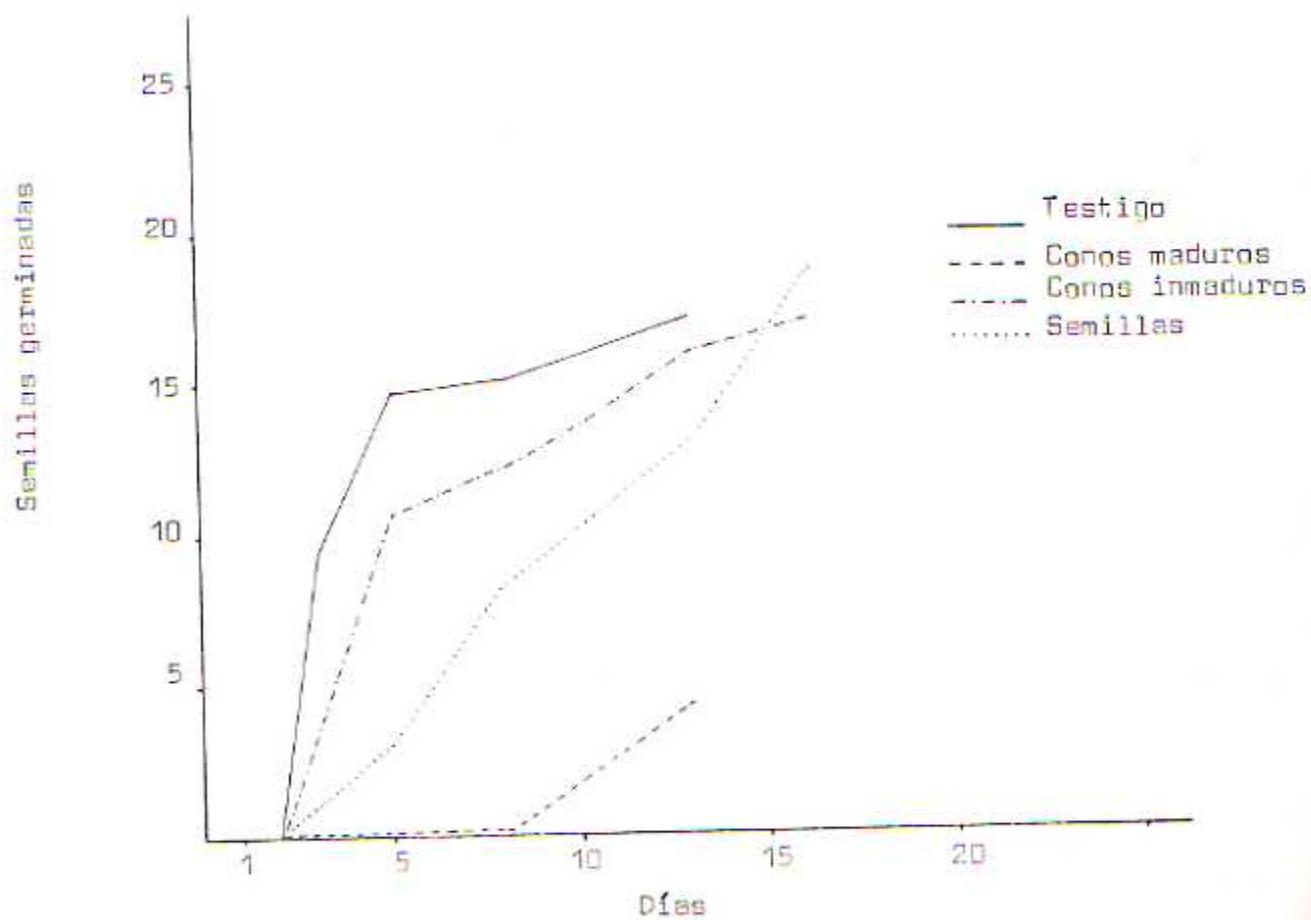


FIGURA 9. Germinación de semillas de *Bidens* sp. en extractos acuosos de partes reproductivas de cíprás. Agosto 1976.

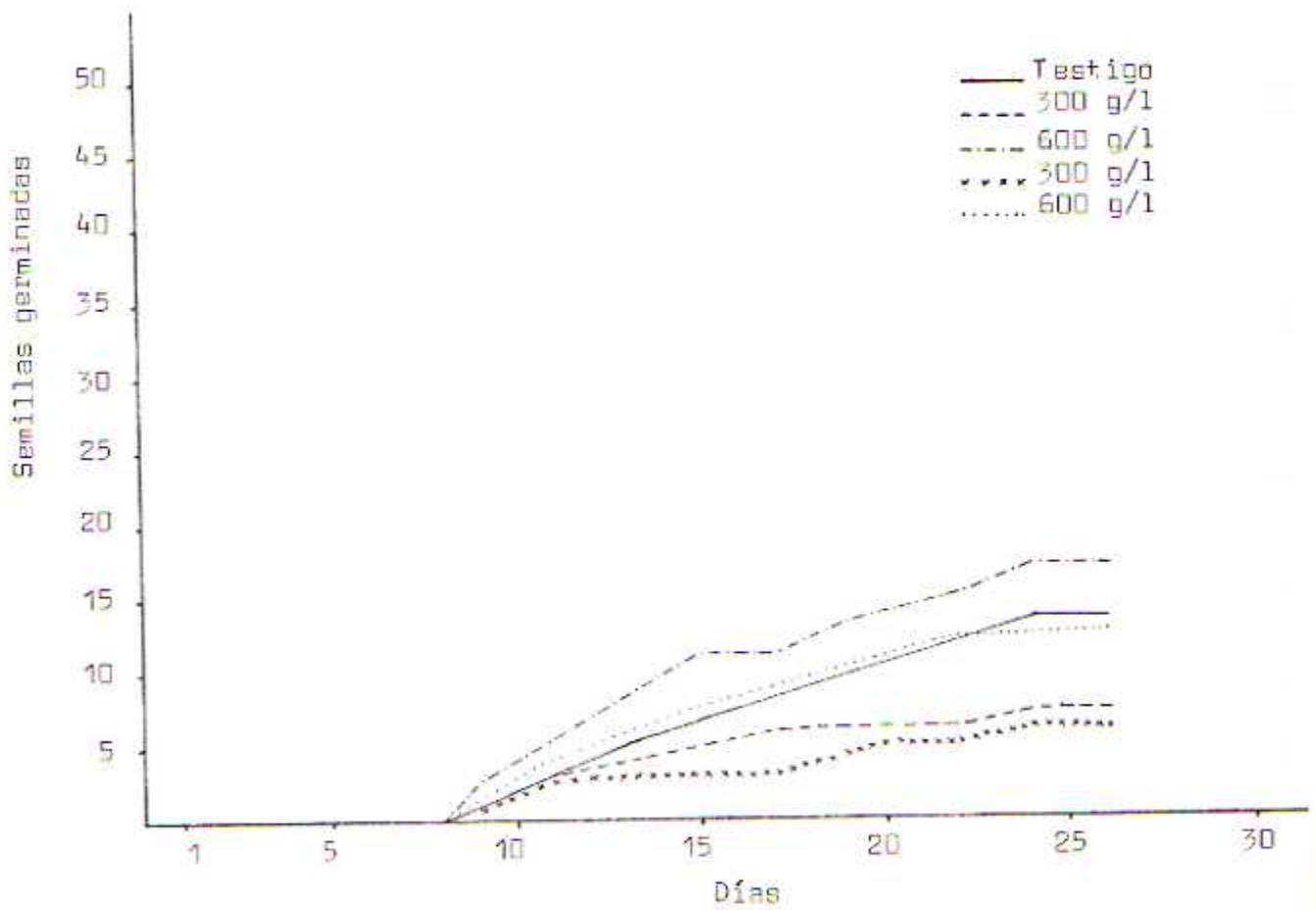


FIGURA 10. Germinación de semillas de ciprés en diferentes extractos acuosos de hoja de ciprés. Setiembre 1976.

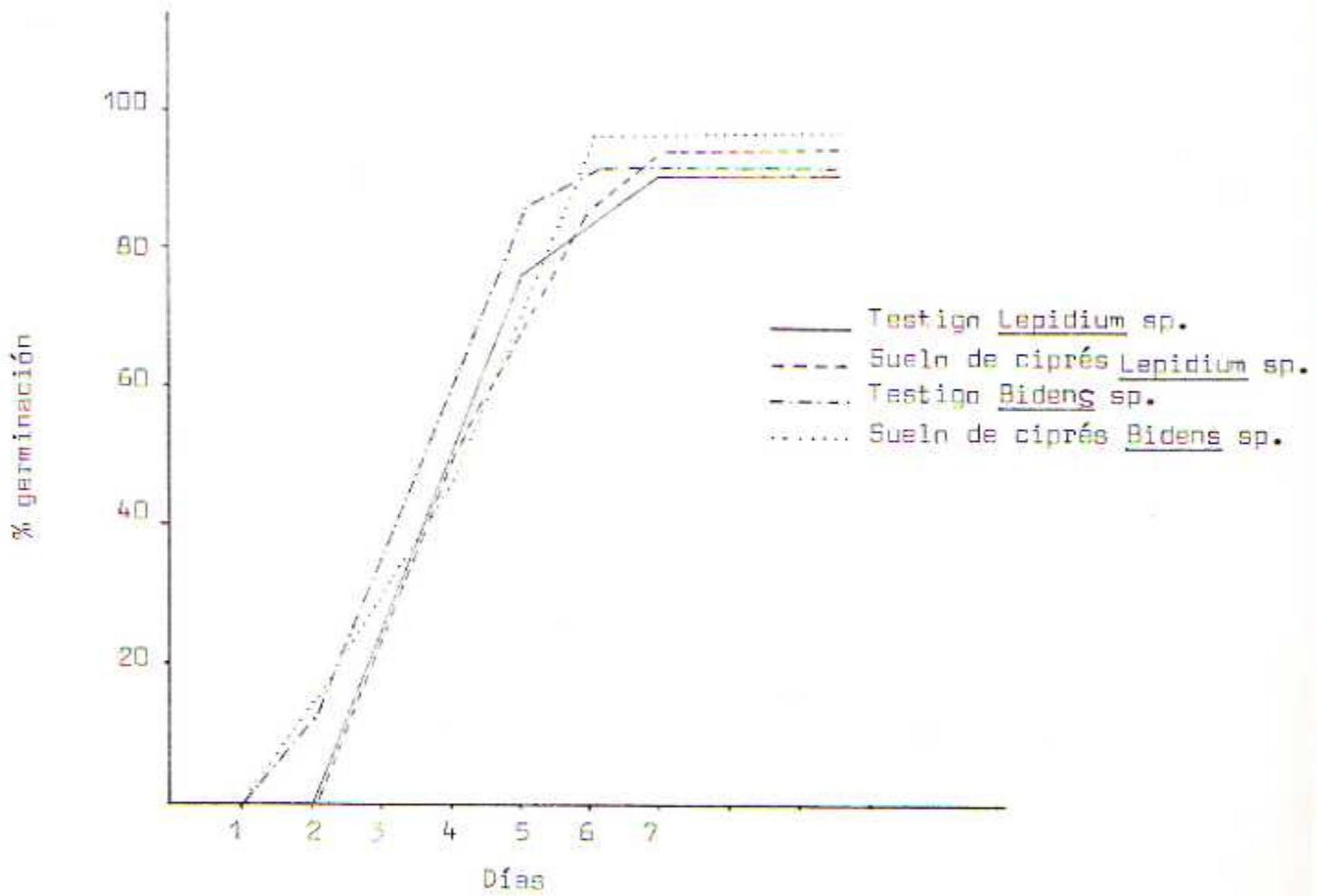


FIGURA 11. Germinación de semillas de *Lepidium* sp. y *Bidens* sp. en contacto con suelo de ciprés. Setiembre 1976.

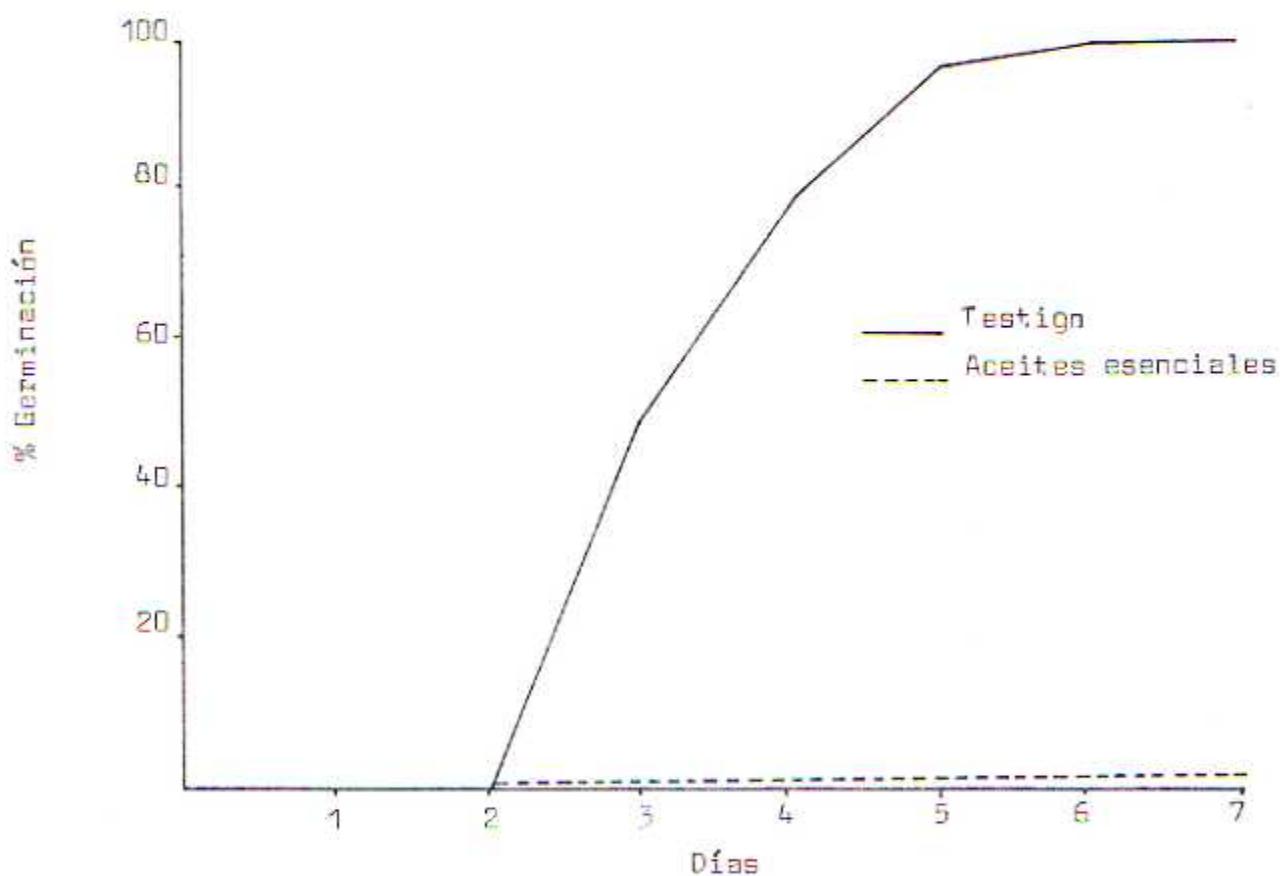


FIGURA 12. Germinación de semillas de Lepidium sp. en presencia de extracto de aceites esenciales de ciprés. Julio 1976.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La ontogenia no es un proceso continuo ya que en ella se intercalan períodos de inhibición y de actividad en un mismo ciclo normal de vida. Algunos de los inhibidores los proporciona el ambiente externo (sustancias alelopáticas), aunque generalmente es el mismo organismo el que regula sus propios procesos fisiológicos (7, 10).

En este estudio se determinó la presencia de un complejo inhibidor en Dupressus lusitanica, producido tanto en partes vegetativas como reproductivas de la planta (Figuras 1, 2, 3, 6, 7, 8 y 9). Las sustancias presentes en los extractos, al estar en contacto con semillas de hierbas, hicieron que el período de germinación se atrasara durante un tiempo variable (3 a 10 días aproximadamente dependiendo de la especie). La literatura consultada informa de un buen número de inhibidores de origen vegetal, pero se considera que en la mayoría de las plantas, estas sustancias fitotóxicas se encuentran en muy pequeñas cantidades. Para comprobar su efecto en el laboratorio deben concentrarse a niveles superiores a los presentes en las plantas en su estado natural (4).

El complejo inhibidor del ciprés presenta una serie de características propias. De acuerdo a la época del año en que se realice la extracción los resultados varían notablemente. En la estación

seca las plantas se encuentran en un período de reposo o inactividad, el metabolismo se reduce al mínimo y la cantidad de sustancias secundarias producidas es muy poca, lo mismo que su liberación por la falta de agua para arrastrarlas. En las pruebas realizadas en los meses de febrero y marzo no se observó efecto inhibitorio sobre la germinación (Figuras Nº 4 y 5; Cuadro Nº 1). Durante la estación seca, la competencia de otras plantas con el ciprés se reduce notablemente lo que no justifica la producción de inhibidores en esas circunstancias. En la estación lluviosa, a diferencia de la seca, se alcanzaron concentraciones muy altas del inhibidor, y por lo tanto una inhibición muy considerable (Figuras Nº 6, 7, 8 y 9). Este efecto de estacionalidad no se encuentra comentado o relacionado en los trabajos de alelopatía.

En todas las pruebas con concentraciones variables, a una mayor concentración del inhibidor se observó una mayor respuesta de inhibición (Figuras Nº 1, 2 y 3). Existe una serie de concentraciones típicas para cada especie en las que la inhibición muestra una correspondencia entre el estímulo y la respuesta. En una serie de concentraciones de inhibidores se encuentra: un umbral de inhibición, un estímulo mínimo que produce la primera respuesta visible; un conjunto de respuestas crecientes ante estímulos crecientes y una respuesta máxima, o sea que por más aumento del estímulo la respuesta se mantiene igual. No hay muchas referencias sobre el

tema en la literatura de la alelopatía, ya que la mayoría de las pruebas son realizadas con una sola concentración (14, 26).

El ciprés no mostró efecto inhibitor sobre sus propias semillas (Figura Nº 10). Algunas de las especies sí presentan esta inhibición llamada autotoxicidad (34) que se demuestra en comunidades ya estables con una menor cobertura y vigor de las plantas en el centro de los rodales (21, 22, 35, 37).

En las pruebas con extractos de las diversas partes vegetativas y reproductivas del ciprés los resultados fueron muy diferentes. Es evidente que las partes reproductivas del ciprés son capaces de producir o almacenar la mayor cantidad de sustancias inhibitoras (Figuras Nº 8 y 9). Sobre este aspecto la literatura es escasa ya que la mayoría de las investigaciones se han realizado con hojas, raíces y plantas enteras (14, 26, 38).

Hay una relación directa entre la alelopatía y la iluminación. En casi todas las pruebas se colocó unas placas en la oscuridad y el resultado de germinación fue mayor. Este efecto alelopático disminuido hace suponer necesaria la presencia de la luz, lo que califica al fenómeno de fotodinámico (7). Una posible explicación es que el inhibidor necesite de la luz como catalizador para llevar a cabo el proceso de inhibición.

Las especies de hierbas usadas como indicadores de inhibición presentan diferente receptividad ante las sustancias activas. En general cada especie muestra una susceptibilidad preferente por los grupos de sustancias que actúan como inhibidores. Hay especies bastante resistentes a la presencia de inhibidores de cualquier grupo químico, y por el contrario también las hay muy tolerantes. Además de la composición química del inhibidor, influye en la susceptibilidad de una especie la forma de la semilla o de la planta. En el presente trabajo se observó que si la semilla o la planta presenta mucílago como es el caso en Lepidium sp., las vellosidades o cualquier otra estructura de mayor superficie o de mejor adsorción, facilita la penetración y almacenamiento del inhibidor. Es también importante la cantidad de cutina presente en la epidermis, ya que en ésta se absorben rápidamente los inhibidores solubles en lípidos (3, 7, 14).

El proceso de extracción influyó sobre los resultados de inhibición. Las extracciones acuosas simples (sin maceración) de aspecto cristalino, tuvieron un efecto moderado de inhibición (Figuras Nº 1 y 2). Con este método los extractos contenían únicamente sustancias solubles en agua. En los extractos con material macerado, de aspecto lechoso, el efecto inhibidor fue muy pronunciado (Figura Nº 3). Al romper las paredes celulares se extrae una serie de sustancias no solubles o poco solubles en agua, o compuestos di-

ferentes a los originales que en el proceso de maceración se transforman. En los extractos con destilación por arrastre con vapor se separaron dos capas, una acuosa y los aceites esenciales. El efecto de las dos fracciones fue muy drástico (Figura Nº 12).

El pH de los extractos acuosos fue medido en algunas pruebas, dando todos alrededor de 5,0, valor ligeramente más bajo que el del suelo, y sin efecto aparente en los procesos normales de germinación y crecimiento en las especies indicadoras de inhibición.

El inhibidor del ciprés parece muy volátil y su efecto desaparece rápidamente. En relación directa con esta idea está el hecho de que las experiencias realizadas con suelo de bosque de ciprés no presentaron ninguna inhibición (Figura Nº 11). La explicación puede ser una rápida volatilización o un almacenamiento muy pobre en los coloides del suelo. Otra observación interesante es que en las placas con una marcada inhibición, las semillas germinaron normalmente después de un lavado. El efecto residual del inhibidor es mínimo en estos casos de lavado y un poco mayor al dejar al inhibidor a que pierda su efecto por un largo período de exposición (30, 37).

El estudio de alelopatía en general, y el caso del ciprés especificamente, se encuentra en sus etapas preliminares. Una determi

nación química del o de los inhibidores presentes en los extractos acuosos y de aceites esenciales del ciprés sería el próximo paso en futuras investigaciones. Al conocerse la composición química del inhibidor se podría pensar en una dosificación para experimentar con el ciprés como posible hierbicida natural. Otro de los importantes posibles usos sería retardar el período de germinación para transporte y almacenamiento de semillas. Es además de gran importancia investigar las implicaciones que tiene la reforestación con ciprés, ya que éste influye directamente a través de las sustancias alelopáticas en una pobre formación de sotobosque, lo que crea un peligro de erosión en suelos livianos y de alta pendiente.

## RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la presencia de un complejo inhibidor en el ciprés, Cupressus lusitanica Mill. Se observó un efecto inhibidor de los extractos acuosos de partes vegetativas y reproductivas del ciprés en diferentes concentraciones, sobre la germinación de semillas de varias especies de hierbas (Lepidium costaricensis, Bidens pilosa y Rumex crispus). Estas hierbas empleadas como indicadores de inhibición presentaron diferentes grados de susceptibilidad ante el complejo inhibidor. La producción del inhibidor presenta estacionalidad, correspondiendo la baja producción con la época seca y la alta con la lluviosa. Los extractos de ciprés de varias concentraciones aplicados sobre semillas de ciprés no presentaron efecto autotóxico. El efecto residual del inhibidor en las semillas y en el suelo es mínimo. Las semillas expuestas al inhibidor después de algún tiempo o después de lavadas con agua germinaron normalmente.

### LITERATURA CITADA

1. Abdul-Wahab, A.S. y E.L. Rice. Plant inhibition by Johnson grass and its possible significance in old-field succession. Bull. Torrey Bot. Club 94(6): 486-497 1967.
2. Baker, H.G. Volatile growth inhibitors produced by Eucalyptus globulus. Madroño 18: 207-210 1966.
3. Bonner, J. The role of toxic substances in the interactions of higher plants. Bot. Rev. 16:51-65 1950.
4. Bonner, H. Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. Bot. Rev. 26: 393-424 1960.
5. Dyson, W.G. y G.A. Herbin. Studies on plant cuticular waxes. IV Phytochemistry 7: 1334-1339 1968.
6. Evans, L.T. Extrapolation from controlled environments to the field. En: L. T. Evans ed. Environmental control of plant growth. Academic Press. New York, 1963. pp. 421-437.
7. Evenari, M. Germination inhibitors. Bot. Rev. 15: 153-194. 1949.
8. Fairbrothers, D.E. Modern methods in plant taxonomy. Academic Press. New York, 1968. pp. 141-173.
9. Floyd, G. L. y E. L. Rice. Inhibition of higher plants by three bacterial growth inhibitors. Bull. Torrey Bot. Club 94(3): 125-129 1967.
10. Garb, S. Differential growth-inhibitors produced by plants. Bot. Rev. 27: 422-443 1961.
11. Guenzi, W. D. y T. M. McCalla. Presence and persistence of phytotoxic substances in wheat, oat, corn and sorghum residues. Agron. J. 59: 163-165 1967.
12. Kefeli, V. I. y S. C. Kadyrov. Natural growth inhibitors. Their chemical and physiological properties. Ann. Rev. Plant Physiol. 22: 185-193 1971.

13. Langford, A. N. y M. F. Buell. Integration, identity and stability in the plant association. En: J. Cragg eds. Advances in ecological research. Academic Press. New York, 1969. pp. 83-135.
14. Le Tourneau, D. y G. D. Feiles. The effect of aqueous extracts of plant tissue on germination of seeds and growth of seedlings. Weeds 4: 363-368 1956.
15. Loehwing, W. F. Root interactions of plants. Bot. Rev. 3: 195-239. 1937.
16. Lutwick, L. E. y W.A. DeLong. Leachates from decomposing leaves. II Interactions with soil forming materials. Canadian J. Agri. Sci. 34: 203-213 1954.
17. Manasse, R. y W.A. Corpe. Bacterial inhibition by two plant extracts. Bull. Torrey Bot. Club 92(5): 364-371 1965.
18. Mecklenburg, R. A. y H. B. Tukey. Influence of foliar leaching on root-uptake and translocation of Calcium-45 to the stems and foliage of Phaseolus vulgaris. Plant Physiol. 39: 533-536 1964.
19. Moral, R. del y H. Muller. Fog drip: a mechanism of toxin transport from Eucalyptus globulus. Bull. Torrey Bot. Club 96: 467-475 1969.
20. Muller, C. H. Inhibitory terpenes volatilized from Salvia shrubs. Bull. Torrey Bot. Club 92(1): 38-85 1965.
21. \_\_\_\_\_ y R. del Moral. Soil toxicity induced by terpenes from Salvia leucophylla. Bull. Torrey Bot. Club 93(2): 130-137 1966.
22. \_\_\_\_\_. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition. Bull. Torrey Bot. Club 93(5): 332-351 1966.
23. \_\_\_\_\_ y Ch. Chan-Hung. Phytotoxin: an ecological phase of phytochemistry. En: J.B. Harborne ed. Phytochemical Ecology. Academic Press. New York, 1972. pp. 201-216.

24. Muller, W. Volatile materials produced by Salvia leucophylla: Effects on seedling growth and soil bacteria. Bot. Gaz. 126: 195-200 1965.
25. Perry, S. F. Inhibition of respiration by juglone in Phaseolus and Lycopersicon. Bull. Torrey Bot. Club 94(1): 26-80. 1967
26. Putnam, A. Biological suppression of weeds: Evidence of Allelopathy in accessions of cucumber. Science 185: 370-372 1974.
27. Rice, E. L. Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. I. Ecology 45: 824-837 1964.
28. \_\_\_\_\_ . Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. II. Physiol. Plantarum 18: 255-267 1965.
29. \_\_\_\_\_ . Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. III. Proc. Acad. Science 45: 43-44 1965.
30. Steward, F. C. Effects of environment on metabolic patterns. En: L. T. Evans ed. Environmental control of plant growth. Academic Press. New York, 1963. pp. 195-214.
31. Tukey, H.B. y R.A. Meeklenburg. Leaching of metabolites from foliage and subsequent reabsorption and redistribution of the leachate in plants. Am. J. Bot. 51: 737-742 1964.
32. \_\_\_\_\_ . Leaching of metabolites from above ground plant parts and its implications. Bull. Torrey Bot. Club 93(6): 385-401 1966.
33. Varga, M. y E. Kovacs. Phenolic acids as growth and germination inhibitors in fruits. Nature 183: 401 1959.
34. Webb, L. J. y L. C. Tracey. A factor toxic to seedling of the same species associated with living roots of the nongregarious subtropical rain forest tree Grevillea robusta. J. Appl. Ecol. 4: 13-25 1967.

35. Went, R. W. Plant and chemical environment. En: E. Sondheimer y J. B. Simeone eds. Chemical Ecology. Academic Press. New York, 1970. pp. 71-82.
36. Wittaker, R. H. Dominance and diversity in land plants communities. Science 147: 250-260 1965.
37. \_\_\_\_\_ . The biochemical ecology of higher plants. En: E. Sondheimer y L. B. Simeone eds. Chemical Ecology. Academic Press. New York, 1970 pp. 43-70.
38. Woods, F. V. Biological antagonism due to phytotoxic root exudates. Bot. Rev. 20: 546-569 1960.

