

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

DETECCION DE INHIBIDORES DE LA GERMINACION Y DEL
CRECIMIENTO EN LAS HOJAS DE Piper hispidum.

TESIS QUE PRESENTA

MAGDALENA ROVALO MERINO

PARA OPTAR POR EL TITULO DE

BIOLOGO

CIUDAD DE MEXICO, MAYO DE 1973.

A MIS PADRES

A MI HERMANO

A CONSTANTINO

AGRADECIMIENTOS.

A la M. en C. Ana Luisa Anaya Lang por su atinada dirección y constante apoyo.

Al Dr. Arturo Gómez-Pompa por sus sugerencias sobre la estructuración de este trabajo y por el apoyo brindado como jefe del Departamento de Botánica del Instituto de Biología, en donde fue realizado el presente trabajo.

Al M. en C. Carlos Vázquez-Yanes por sus valiosos consejos durante la fase experimental, así como por la revisión de este manuscrito.

Al Biól. Javier Valdés G., por las facilidades brindadas para el uso del laboratorio del Jardín Botánico Exterior de la U.N.A.M.

A la M. en C. Silvia del Amo R. y al Biól. Manuel Rico B. por su participación como revisores de este manuscrito.

Al personal de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtles" por la ayuda brindada.

Al Dr. Gabriel Siade, de la División de Estudios Superiores de la Facultad de Química, por el asesoramiento en las técnicas químicas.

Al Dr. Alfredo Feria, del Departamento de Investigación Científica del Centro Médico Nacional (I.M.S.S.) por facilitar el uso del osmómetro, y por su ayuda en el manejo del mismo.

Al personal del laboratorio de programación de la Flora de Veracruz por la ayuda prestada en el manejo y la computación de la información.

A todas las personas que de alguna manera cooperaron en la realización del presente trabajo.

INDICE

	pag.
INTRODUCCION	1
METODOLOGIA	9
RESULTADOS	15
DISCUSION Y CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUCCION.

El presente trabajo* es una contribución al estudio sobre la regeneración de las selvas altas perennifolias en Veracruz (Gómez-Pompa y Vázquez, 1973), y forma parte del estudio sobre interacciones químicas en la sucesión secundaria (Anaya y Gómez-Pompa, 1971).

Las relaciones e interacciones de origen químico entre los seres vivos son casi tan antiguas como la vida. La mayoría de las interacciones entre las especies animales, ya sean éstas de ataque, defensa ó respuesta conductual, no son debidas a la fuerza física sino a a agentes químicos. Entre ellos pueden citarse las quinonas, secretadas por los escarabajos bombarderos (Brachinus sp.) en auto-defensa, y las feromonas, secretadas por algunas especies de hormigas y que funcionan como mensajeros químicos en el comportamiento reproductivo, en la regulación social, en casos de alarma y defensa, ó en la búsqueda de alimento (Whittaker y Feeny, 1971). Estos mismos autores denominan "aleloquímicos" a aquellos compuestos que determinan el establecimiento de una relación entre dos organismos de diferente especie, y definen tres grupos de ellos: las alomonas, que le dan ventaja al organismo que las produce; las kairomonas, que le dan ventaja al organismo que las recibe, y los depresores, que sin darle ventaja al organismo productor perjudican al que las recibe.

La producción de fitotoxinas en las plantas superiores, fenómeno por el cual otras plantas resultan afectadas desfavorablemente.

* Este trabajo pudo realizarse gracias al donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (C.O.N.A.C.Y.T.) # 29, para el estudio de la regeneración de las selvas altas perennifolias en México.

te, ya sea en la germinación, en el crecimiento, en la salud ó en la reproducción, ha sido ampliamente estudiada en el presente siglo (Pickering, 1919; Bonner, 1950; Grümmer, 1961; Evenari, 1961; Baker, 1966; Müller, 1966) y es probablemente un mecanismo importante en los procesos de competencia en las comunidades vegetales de las zonas áridas, templadas y cálido-húmedas. En estas últimas, la lixiviación de metabolitos por la lluvia es intensa, y la acumulación de sustancias químicas en el sustrato determina la complejidad de los fenómenos de intercambio de agua, de sales minerales y de otros solutos importantes - desde el punto de vista ecológico - en la distribución de las especies (Anaya y Rovalo, 1972). Estas sustancias pueden tener un papel de suma importancia en los fenómenos de sucesión secundaria; según Rico y Gómez-Pompa (1973) existen en términos generales tres grandes grupos de vegetación secundaria que pueden reconocerse en el campo con facilidad. El primero está constituido por las etapas sucesionales tempranas, dominadas por especies herbáceas y por otras especies que en esta época tienen la forma biológica de hierbas; dichas etapas se caracterizan por un gran número de individuos en relación con las especies ó sea por una baja diversidad. Estos individuos se sustituyen rápidamente en las primeras etapas y disminuyen en número con el tiempo, ocurriendo una gran selección natural en un breve lapso. El segundo grupo se caracteriza por la dominancia de los arbustos y corresponde a estados sucesionales de dos a seis años; el último grupo se encuentra dominado por los árboles.

La liberación en el medio de las fitotoxinas posiblemente

determina la supresión de algunas plantas en las primeras etapas sucesionales ó simplemente la detención en el crecimiento, a través de la alelopatía.

Según Evenari (1961), para que la alelopatía tenga importancia ecológica, es necesario que el fenómeno ocurra bajo condiciones naturales, por lo que la experimentación en el laboratorio, por sí sola, no puede probarla. Sin embargo, la comprobación de la existencia de sustancias alelopáticas en el laboratorio sí puede probar la alelopatía, siempre y cuando los resultados no se extrapolen a las condiciones naturales.

La gran mayoría de las sustancias potencialmente involucradas en la alelopatía se excretan como productos metabólicos secundarios (Müller, 1966) ó son producto de la selección natural. Se liberan de las plantas de diversas maneras, ya sea por lixiviación, volatilización, arrastre por la niebla ó exudación por las raíces (Tukey, 1969).

Los compuestos alelopáticos más importantes son: los terpenos, los ácidos fenólicos, los flavonoides, los esteroides, los alcaloides, y los cianuros orgánicos (Whittaker y Feeny, 1971). Según Müller (1965) los terpenos se encuentran en los aceites esenciales e inhiben la germinación penetrando en las células por la vía de los lípidos, desde la membrana hasta entrar en contacto con la estructura vital ó la función que alteran. El mismo autor dice que la inhibición parece ser el resultado de la detención de la división celular, ó sea la supresión de la mitosis y de la elongación celular.

Según Garb (1961), dentro de un género en particular pue...

den existir diferencias considerables en la capacidad de secreción de inhibidores del crecimiento; la mayoría de los inhibidores vegetales estudiados hasta ahora se elabora en las raíces y en las hojas. Sin embargo, los compuestos elaborados en las raíces pueden acumularse en las hojas, ó acumularse en las raíces aquellos compuestos elaborados en otras partes de la planta. En la investigación de este tipo de sustancias se tendrá más éxito si se estudian aquellas especies que crezcan aisladas en un lugar, o que muestren franca incompatibilidad con otras plantas (Garb, 1961).

Entre los trabajos que se consideran más importantes sobre inhibidores químicos del crecimiento y de la germinación, por estar más relacionados con el contenido y la metodología del presente trabajo, se encuentran los siguientes: Gray y Bonner (1948), encontraron un efecto inhibitor en el crecimiento de las plantas de tomate aplicando hojas secas de Encelia farinosa en la superficie del medio de cultivo; probaron extractos acuosos y extractos etéreos, siendo estos últimos menos inhibidores que los primeros. Yardeni y Evenari (1952), ensayaron la acción de hojas y de extractos acuosos de las mismas, de cuatro especies: Myrtus communis, Eucalyptus rostrata, Laurus nobilis y Pinus halapensis, en semillas de trigo y plántulas de tomate, encontrando que las dos primeras especies fueron más inhibitoras que las segundas. Le Tourneau et al. (1956), estudiaron los extractos acuosos de Euphorbia esula y Agropyron repens, siendo los extractos de las hojas más inhibitoras que los de los tallos. Lawrence y Kilcher (1962) apreciaron diferencias en la longitud de la raíz de plantas de cultivo al ser tratadas con extractos de raíz.

ces de catorce especies diferentes. Moore (1963), encontró en los aquenios de Cercocarpus montanus una sustancia, soluble en agua, inhibidora de la germinación de varias especies. Knipe y Herbel (1966), encontraron que el extracto acuoso de las hojas de Larrea tridentata redujo significativamente la germinación en Bouteloua eriopoda, y que aparentemente, las concentraciones osmóticas relativamente bajas ó el pH moderado no fueron los responsables de dicha reducción. Olmstead y Rice (1970), probaron seis compuestos fenólicos conocidos de plantas de la primera etapa de la sucesión, sobre especies de esta misma etapa, encontrando que éstas desaparecieron por inhibición química; sin embargo, al aplicar estos compuestos fenólicos sobre Aristida oligantha, una planta típica dominante de la segunda etapa de la sucesión, encontraron que esta especie no fue afectada, lo que implica una selectividad de acción de los inhibidores químicos a través de la sucesión.

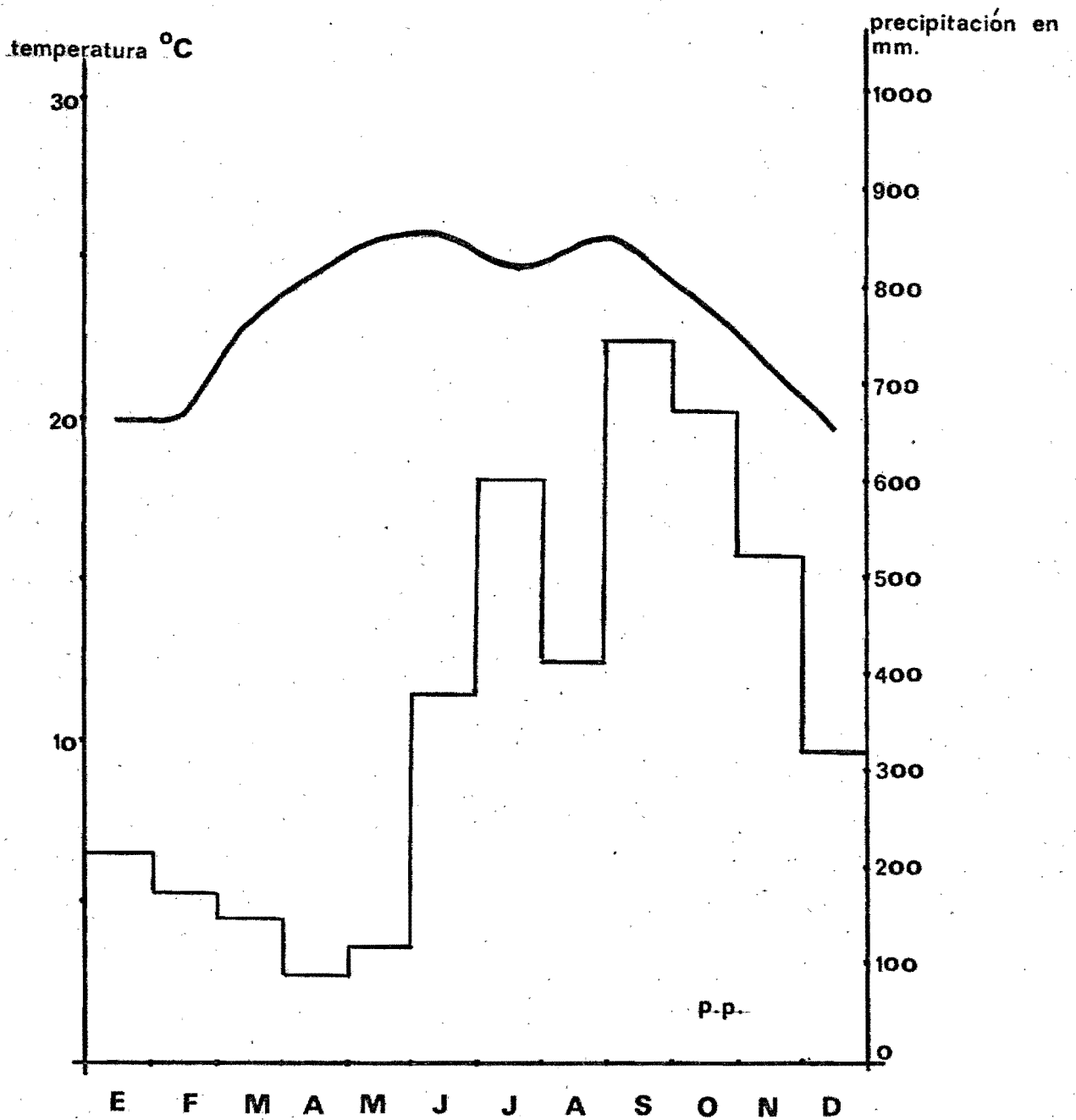
La germinación y el crecimiento son procesos vitales que requieren de muchos y complejos factores para llevarse a cabo, y muchas veces la fisiología anormal de una planta es el resultado de la interacción de dos ó más de estos factores, ya sean químicos ó de otro tipo. Entre los factores no químicos que afectan la germinación y el crecimiento se cuenta la luz, ya que en el ciclo de vida de las plantas superiores hay períodos de latencia debidos a la falta de este factor, o a una determinada longitud de onda (Evenari, 1965); la luz también puede detener la germinación de las semillas que la requieran cuando éstas se encuentran enterradas en el suelo

y promoverla cuando están en la superficie (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963); el pH no es un factor decisivo durante la germinación, dado el poder amortiguador de las semillas (Mayer y Evenari, 1953); la temperatura, que está ligada a los fenómenos de latencia embrionaria e inhibición tegumentaria (Côme, 1970); y la presión osmótica, que es un factor poderoso en la inhibición de la germinación y del crecimiento. Los datos reportados por Dotzenko y Dean (1959), demuestran que el número de semillas de alfalfa que germina decrece a medida que se aumenta la presión osmótica del medio, ya que las concentraciones elevadas de sales inhiben la capacidad de absorber y retener agua (Rudolfs, 1921). Es por esta razón que se incluyen en este trabajo estudios de tolerancia a la presión osmótica, tomando en cuenta la importancia que puede tener la osmolaridad controlada de los extractos vegetales sobre la germinación y el crecimiento de las especies experimentales (Anaya y Rovalo, 1972).

Los estudios realizados por Anaya y Gómez-Pompa (1969, 1971) en las especies de la vegetación secundaria en una zona cálido-húmeda de México, han demostrado la presencia de sustancias inhibidoras de la germinación en las hojas de Piper auritum y en los frutos de Siparuna nicaragüensis. Para el presente trabajo se eligió la especie Piper hispidum como posible productora de fitotoxinas, ya que al igual que Piper auritum, es dominante de los estratos superiores en las comunidades secundarias jóvenes de la Estación de Biología Tropical " Los Tuxtla " ; las comunidades secundarias se denominan localmente acahuales. La Estación, dependiente de la Universidad Nacional Autónoma de México, se encuentra localizada en el sureste de

la República Mexicana, en la planicie costera del Golfo de México, dentro de la zona cálido-húmeda del estado de Veracruz, siendo la vegetación dominante la selva alta perennifolia (Flores, 1971). La gráfica de clima de la región, elaborada con datos de Coyame, una de las estaciones meteorológicas más próxima a la Estación "Los Tuxtlas", se encuentra en la figura "a" (tomada de García, 1970).

Piper hispidum, de la familia Piperaceae, se presenta con más abundancia en los acahuales de uno a cuatro años, es menos abundante en los de cuatro a diez y está ausente o muy escaso en los de diez a cincuenta (Gómez-Pompa, 1971). Se presenta en diversas formas difícilmente distinguibles entre sí en México, América Central y Sudamérica (Trelease, 1950). Esta especie representa uno de los problemas más característicos en la taxonomía de las especies de Piper, dada la notable variación de los ejemplares de esta especie y la gama de diferencias en sus caracteres; solamente para Panamá se han citado veinte sinónimos y probablemente sea la especie de más compleja sinonimia (Gómez-Pompa, 1966).



Estación Coyame.

figura "a"

1961 -
1970

METODOLOGIA.

Las pruebas de tolerancia a la presión osmótica se realizaron con concentraciones conocidas de manitol, desde 0.02 M. hasta 0.3 M. No se utilizaron sales puesto que su toxicidad iónica alteraría los resultados en la germinación y en el crecimiento (Rudolfs, 1921).

Para la realización de los extractos se utilizaron hojas colectadas en el mes de agosto, de una población de Piper hispidum (fotografías 1 y 2) localizada en los acahuales de siete años de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas".

Las hojas fueron deshidratadas en horno a 50.60°C., y con ellas se hicieron tres tipos de extracciones, las dos primeras similares en lo posible a la vía natural de liberación de fitotoxinas:

I) Extractos acuosos homogeneizados en licuadora durante un minuto:

- a) 1 gramo de hojas en 100 ml. de agua destilada.
- b) 4 gramos de hojas en 100 ml. de agua destilada.

Estas concentraciones se eligieron en función de la tolerancia a la presión osmótica de las especies experimentales.

II) Arrastre por vapor de aceites esenciales, que consiste en volatilizar una sustancia que es insoluble ó prácticamente insoluble en agua, pasando vapor por una mezcla del compuesto más agua (Vogel, 1956). Esta sustancia puede ser fácilmente separada del líquido destilado puesto que no es miscible en agua. En este caso se

aisló con éter, evaporándose posteriormente este solvente, y emulsificándose 0.1 ml. de aceite esencial por 10 ml. de agar al 1 % (fotografía # 3).

III) Además de estos dos métodos, se hicieron extracciones con diferentes solventes en el aparato denominado Soxhlet (fotografía # 4), con el fin de facilitar la investigación química de la sustancia responsable de la inhibición.

Se utilizaron 14 g. de hojas secas para cada una de las siguientes secuencias de extracción, de menor a mayor polaridad:

acetato de etilo. metanol agua destilada.

hexano acetona agua destilada.

Todos los solventes a excepción del agua destilada, se evaporaron a sequedad y el residuo vegetal se solubilizó en baño María con 350 ml. de agua destilada, o sea una concentración equivalente a 4 % de hojas secas colocadas inicialmente en el Soxhlet. El residuo vegetal fue de 6 g. para el hexano, 8 g. para la acetona, 9 g. para el acetato de etilo y 7 g. para el metanol. Se midió la presión osmótica de cada uno de los extractos en un osmómetro de punto de congelación, así como el pH y los datos se reportan en la Tabla A.

Todos los tratamientos se solidificaron con agar al 1 % y se aplicaron en cajas de Petri, conteniendo 10 ml. de agar cada una, con tres repeticiones de 33 semillas. El medio de cultivo de los grupos testigo fue agar más agua destilada al 1 %.

Se eligieron cinco especies de la vegetación secundaria de la misma Estación para llevar a cabo los ensayos de germinación, de

acuerdo con los requerimientos específicos de cada una de ellas ...
(Vázquez-Y., 1973).

Especie	Familia	Horas de germinación.
1) <u>Mimosa pudica</u> L.	Leguminosae	72
2) <u>Achyranthes aspera</u> L.	Amaranthaceae	120
3) <u>Bidens pilosa</u> L.	Compositae	120
4) <u>Heliocarpus donnell-smithii</u> Rose	Tiliaceae	120
5) <u>Solanum nitens</u> Baker	Solanaceae	360

Las condiciones de temperatura y luz fueron las mismas para todas las especies, en una cámara de germinación a 25.27°C. En todos los bioensayos se cuantificó la longitud de raíz y tallo y el porcentaje de germinación. Los datos se analizaron estadísticamente por la prueba de F en el laboratorio de programación de la Flora de Veracruz, del Instituto de Biología y en el Centro de Investigaciones Matemáticas de Sistemas y Servicios (C.I.M.A.S.S.) de la U.N.A.M.



Arbustos de Piper hispidum en

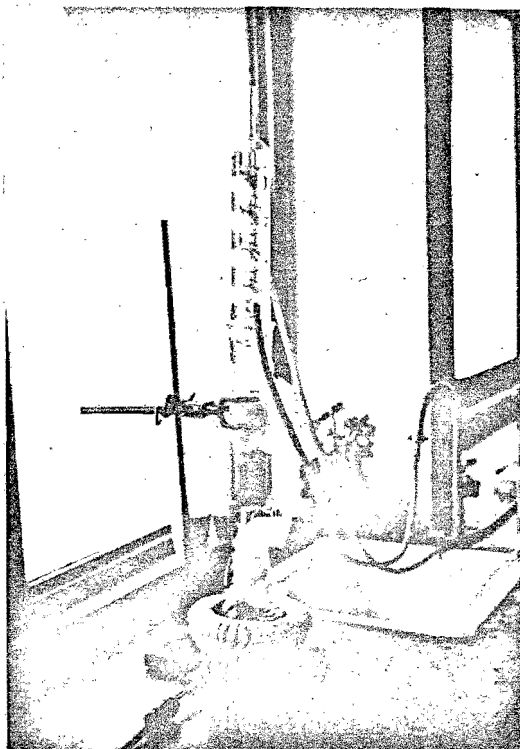
la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas.





foto 3

**Dispositivo para el arrastre por vapor
de aceites esenciales.**



SOXHLET

foto 4

RESULTADOS

T A B L A A .

TRATAMIENTO	ABREVIACION	PRESION OSMOTICA EN MILIOSMOLAS.	pH	CONCENTRACION
TESTIGO	T	-----	7.0	-----
MANITOL	-----	20	6.5	0.02 M.
MANITOL	-----	40	6.5	0.04 M.
MANITOL	-----	60	6.5	0.06 M.
MANITOL	-----	80	6.5	0.08 M.
MANITOL	-----	100	6.5	0.10 M.
MANITOL	-----	200	6.5	0.20 M.
MANITOL	-----	300	6.5	0.30 M.
MANITOL	-----	400	6.5	0.40 M.
EXTRACTO ACUOSO DE ACETATO DE ETILO	acetato de etilo	17	6.5	2.57 g. residuo/ 100 ml. agua dest.
EXTRACTO ACUOSO DE METANOL	metanol	22	6.5	2.00 g. residuo/ 100 ml. agua dest.
EXTRACTO ACUOSO POST ACETATO DE ETILO- METANOL	AEM	45	6.5	Equivalente a 4 g. hojas secas/ 100 ml. agua dest.
EXTRACTO ACUOSO DE HEXANO	hexano	15	6.5	1.70 g. residuo/ 100 ml. agua dest.
EXTRACTO ACUOSO DE ACETONA	acetona	18	6.0	2.28 g. residuo/ 100 ml. agua dest.
EXTRACTO ACUOSO POST HEXANO - ACETONA	HEXA	45	6.5	Equivalente a 4 g. hojas secas/ 100 ml. agua dest.
1 gramo de hojas secas/ 100 ml. agua dest.	1/100 hojas	20	6.5	-----
4 gramos de hojas secas/ 100 ml. agua dest.	4/100 hojas	46	6.0	-----
ACEITE ESENCIAL	-----	-----	-----	0.1 ml/ 10 ml. medio de cultivo

TABLA B

PORCENTAJE DE LONGITUD DE RAIZ

ESPECIE TRATAMIENTO	<u>Mimosa</u> <u>pubica</u>	<u>Achyranthes</u> <u>aspera</u>	<u>Bidens</u> <u>pilosa</u>	<u>Heliocarpus</u> <u>donnell-smithii</u>	<u>Solanum</u> <u>nitens</u>
ACETATO DE ETILO	19.5	18.8	0.0	0.0	0.0
METANOL	64.0	38.5	36.0	35.5	45.5
EXTRACTO ACUOSO AEM	55.5	152.0	65.5	80.5	79.5
HEXANO	7.2	0.0	0.0	0.0	0.0
ACETONA	20.5	14.0	0.0	0.0	0.0
EXTRACTO ACUOSO HEXA	21.5	0.0	29.5	22.0	24.5
1 / 100 HOJAS	44.5	21.5	22.5	18.5	15.0
4 / 100 HOJAS	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ACEITE ESENCIAL	9.7	0.0	0.0	0.0	0.0

TABLA C

PORCENTAJE DE LONGITUD DE TALLO

ESPECIE TRATAMIENTO	<u>Mimosa</u> <u>pubica</u>	<u>Achyranthes</u> <u>aspera</u>	<u>Bidens</u> <u>pilosa</u>	<u>Heliocarpus</u> <u>donnell-smithii</u>	<u>Solanum</u> <u>nitens</u>
ACETATO DE ETILO	24.5	17.5	0.0	0.0	0.0
METANOL	58.5	33.0	74.0	1.1	26.5
EXTRACTO ACUOSO AEM	72.0	132.0	160.0	49.0	124.0
HEXANO	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ACETONA	36.0	0.0	0.0	0.0	0.0
EXTRACTO ACUOSO HEXA	33.0	0.0	31.5	0.3	34.0
1 / 100 HOJAS	52.5	30.5	53.0	0.07	18.5
4 / 100 HOJAS	23.5	0.0	0.0	0.0	0.0
ACEITE ESENCIAL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

TABLA 1

GERMINACION EN Mimosa pudica
Y CRECIMIENTO

TRATAMIENTO	% de Germ.	Longitud raíz mm.	%Long raíz	Longitud tallo mm	%Long tallo	Valor de F raíz	Valor de F tallo
TESTIGO	95	21.63	100	11.40	100	--	--
MANITOL .02 M.	95	21.31	98.5	11.02	97.0	7.04	85.24
MANITOL .04 M.	95	20.92**	96.5	6.37**	47.0	12.83	150.32
MANITOL .06 M.	95	18.71**	86.5	6.67**	58.5	13.77	154.01
MANITOL .08 M.	95	12.98**	60.0	3.46**	30.5	150.27	582.05
MANITOL .10 M.	96	13.25**	61.0	4.31**	37.5	155.93	461.56
MANITOL .2 M.	25	10.81**	50.0	2.63**	23.0	81.20	244.90
MANITOL .3 M.	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETATO DE ETILO	81	4.27**	19.5	2.82**	24.5	562.37	469.78
METANOL	96	13.87**	64.0	6.69**	58.5	115.62	115.90
EXTRACTO ACUOSO A E M	98	12.01**	55.5	8.22**	72.0	222.07	71.30
HEXANO	97	1.53**	7.2	2.97**	26.0	1198.63	556.91
ACETONA	73	4.45**	20.5	4.10**	36.0	526.03	294.83
EXTRACTO ACUOSO HEXA	98	4.60**	21.5	3.78**	33.0	725.56	388.34
1 /100 HOJAS.	71	9.57**	44.5	5.96**	52.5	220.26	104.92
4 /100 HOJAS.	57	2.81**	13.0	2.72**	23.5	603.96	397.29
ACEITE ESENCIAL	61	2.08**	9.7	0	0.0	727.57	947.09

* Significativo al 5%. **Significativo al 1%.

TABLA 2

GERMINACION Y CRECIMIENTO EN Achyranthes aspera

TRATAMIENTO	% Germ.	Longitud raíz mm.	%Long raíz	Longitud tallo mm	%Long tallo	Valor de F raíz	Valor de F tallo
TESTIGO	93	13.86	100	6.78	100	--	--
MANITOL .02 M.	95	9.01**	70.0	4.68**	69.0	58.84	63.48
MANITOL .04 M.	94	11.40**	88.5	5.10**	75.0	9.16	42.41
MANITOL .06 M.	85	11.61**	90.5	4.90**	72.0	9.88	52.37
MANITOL .08 M.	91	8.16**	63.5	4.28**	63.0	80.49	81.66
MANITOL .10 M.	96	5.55**	43.5	4.01**	59.0	197.78	105.81
MANITOL .2 M.	95	5.29**	41.0	4.03**	59.0	259.33	124.89
MANITOL .3 M.	3	4.00**	31.0	3.66**	54.0	12.63	6.95
MANITOL .4 M.	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETATO DE ETILO	5	2.40**	18.8	1.20**	17.5	28.48	37.15
METANOL	68	4.95**	38.5	2.25**	33.0	189.14	225.95
EXTRACTO ACUOSO A E M	98	19.57**	152.0	8.96**	132.0	40.85	37.93
HEXANO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETONA	17	1.82**	14.0	0	0.0	107.01	187.21
EXTRACTO ACUOSO HEXA	0	0	0.0	0	0.0	--	--
1/100 HOJAS	23	2.78**	21.5	2.04**	30.5	119.25	109.74
4/100 HOJAS	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACEITE ESENCIAL	0	0	0.0	0	0.0	--	--

*Significativo al 5%. **Significativo al 1%.

TABLA 3

GERMINACION Y CRECIMIENTO EN Bidens pilosa

TRATAMIENTO	% Germ.	Longitud raíz mm.	%Long raíz	Longitud tallo mm.	%Long tallo	Valor de F raíz	Valor de F tallo
TESTIGO	77	23.67	100	18.51	100	--	--
MANITOL .02 M.	91	19.41*	82.0	26.68**	144.0	5.35	27.40
MANITOL .04 M.	88	21.98	92.5	23.27**	126.0	0.80	10.04
MANITOL .06 M.	72	18.68*	79.0	22.09*	119.5	5.99	5.15
MANITOL .08 M.	51	20.03	86.0	23.84**	129.0	2.40	8.43
MANITOL .10 M.	46	17.34**	73.5	20.08	113.0	7.01	0.82
MANITOL .2 M.	4	3.75**	15.8	2.50**	13.5	7.40	16.79
MANITOL .3 M.	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETATO DE ETILO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
METANOL	46	8.54**	36.0	13.67	74.0	45.17	8.92
EXTRACTO ACUOSO A E M	94	15.54**	65.5	29.57**	160.0	22.65	74.25
HEXANO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETONA	0	0	0.0	0	0.0	--	--
EXTRACTO ACUOSO HEXA	6	7.00**	29.5	5.83**	31.5	7.73	14.54
1 /100 HOJAS	44	5.27**	22.5	9.81**	53.0	67.57	33.78
4 /100 HOJAS	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACEITE ESENCIAL	0	0	0.0	0	0.0	--	--

*Significativo al 5%. **Significativo al 1%.

TABLA 4

GERMINACION Y CRECIMIENTO EN Heliocarpus donnell-smithii

TRATAMIENTO	% GERM.	Longitud raiz mm.	%Long raiz	Longitud tallo mm.	%Long tallo	Valor de F raiz	Valor de F tallo
TESTIGO	78	10.88	100	10.91	100	--	--
MANITOL .02 M.	68	7.50**	69.0	6.92**	63.5	59.63	41.70
MANITOL .04 M.	72	6.93**	63.5	5.90**	54.0	90.37	55.83
MANITOL .06 M.	70	6.78**	62.0	6.55**	60.0	98.82	39.50
MANITOL .08 M.	74	7.28**	66.5	7.63**	70.0	100.76	27.36
MANITOL .10 M.	65	6.55**	60.0	5.38**	49.5	137.07	23.78
MANITOL .2 M.	40	3.55**	32.5	0.97**	0.9	266.19	251.59
MANITOL .3 M.	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETATO DE ETILO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
METANOL	35	3.85**	35.5	1.17**	1.1	179.39	212.78
EXTRACTO ACUOSO A E M	82	8.79**	80.5	5.37**	49.0	20.18	85.02
HEXANO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETONA	0	0	0.0	0	0.0	--	--
EXTRACTO ACUOSO HEXA	13	2.38**	22.0	0.30**	0.3	125.48	98.38
1 /100 HOJAS	23	2.04**	18.5	0.08**	0.07	233.40	182.91
4 /100 HOJAS	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACEITE ESENCIAL	0	0	0.0	0	0.0	--	--

*Significativo al 5%. **Significativo al 1%.

TABLA 5

GERMINACION Y CRECIMIENTO EN Solanum nitens

TRATAMIENTO	% Germin.	Longitud raíz mm.	% Long. raíz	Longitud tallo mm	% Long. tallo	Valor de F raíz	Valor de F tallo
TESTIGO	77	8.10	100	5.83	100	--	--
MANITOL .02 M.	69	4.43**	60.0	3.91**	67.0	64.83	55.68
MANITOL .04 M.	62	2.20**	30.0	2.38**	40.5	196.67	201.12
MANITOL .06 M.	70	4.30**	53.0	3.31**	56.5	63.69	91.55
MANITOL .08 M.	54	2.16**	26.5	1.48**	25.5	168.88	268.72
MANITOL .10 M.	58	2.62**	32.0	1.79**	30.5	156.95	261.53
MANITOL .2 M.	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETATO DE ETILO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
METANOL	54	3.35**	45.5	1.55**	26.5	92.88	251.06
EXTRACTO ACUOSO A E M	79	6.45**	79.5	7.27**	124.0	18.42	10.82
HEXANO	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACETONA	0	0	0.0	0	0.0	--	--
EXTRACTO ACUOSO HEXA	45	1.97**	24.5	1.97**	34.0	160.26	160.26
1 /100 HOJAS	23	1.21**	15.0	1.08**	18.5	109.01	198.66
4 /100 HOJAS	0	0	0.0	0	0.0	--	--
ACEITE ESENCIAL	0	0	0.0	0	0.0	--	--

* Significativo al 5%. **Significativo al 1%.

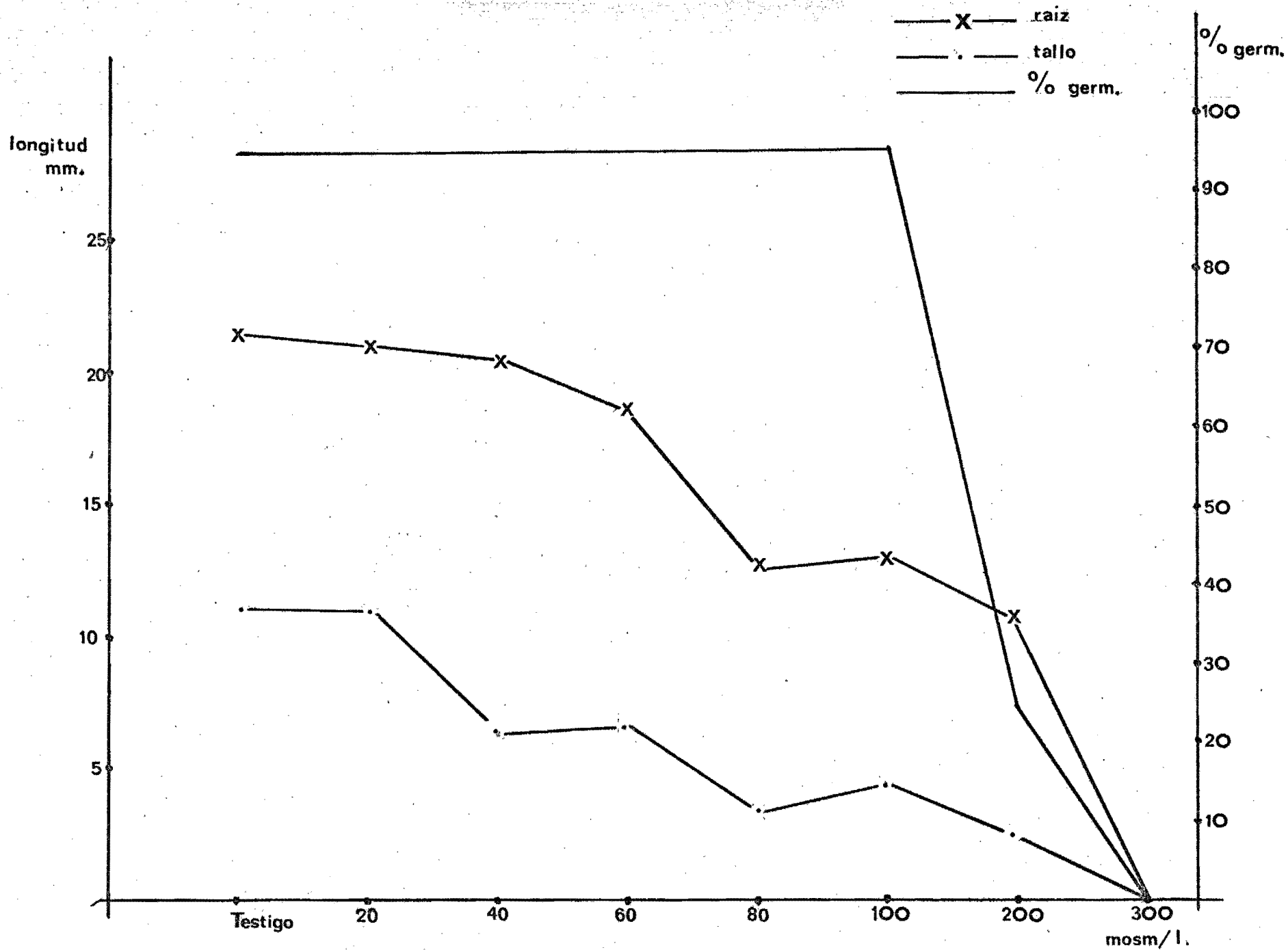


Fig. 1a. Mimosa pudica. Tolerancia a la presión osmótica. 72 hrs. germinación.

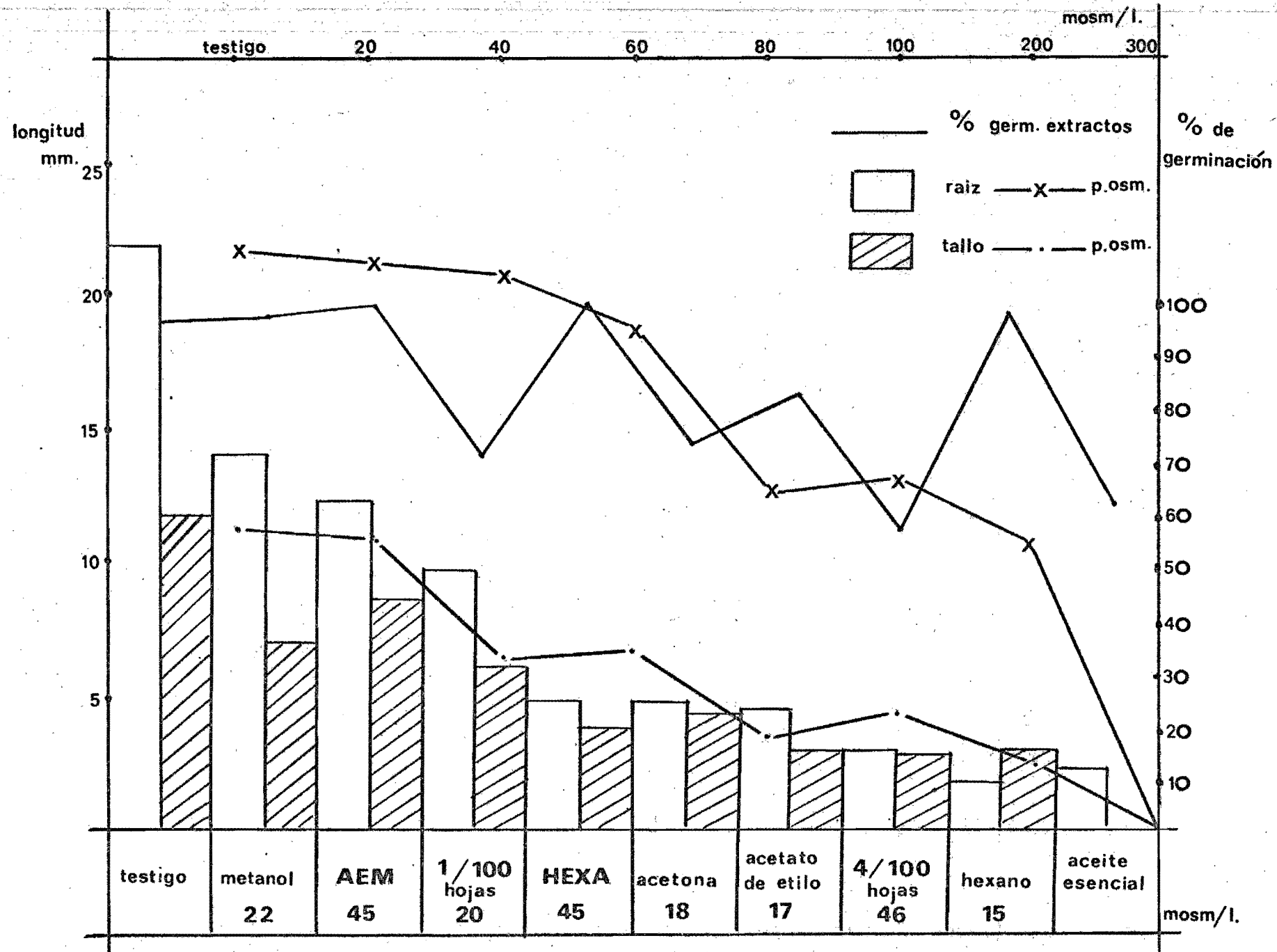


Fig. 1b. Mimosa pudica. Reacción a diferentes extractos de Piper hispidum, 72 hrs. germinación, comparada con el efecto de la presión osmótica.

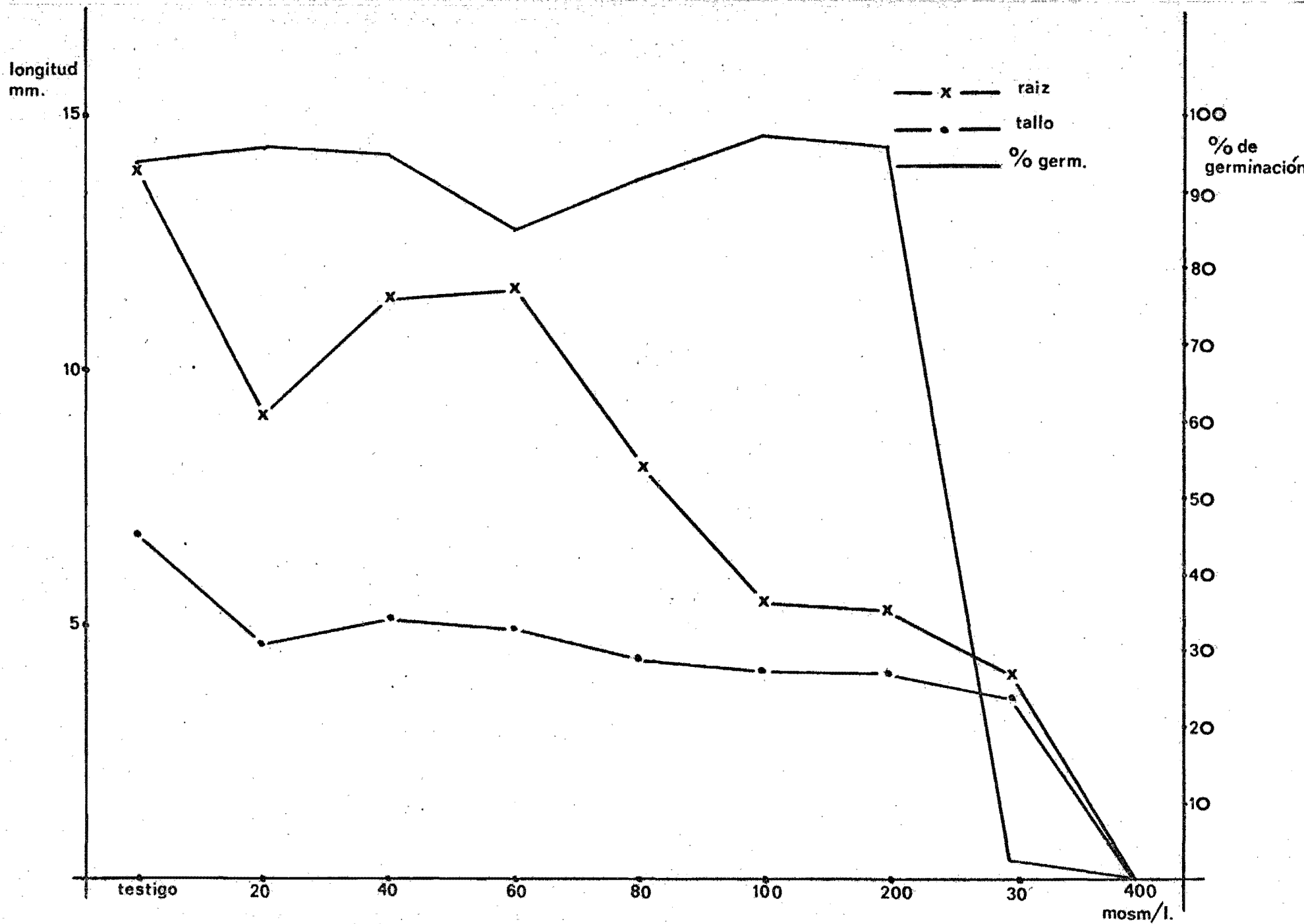


Fig.2a. Achyranthes aspera. Tolerancia a la presión osmótica. 120 horas de germinación.

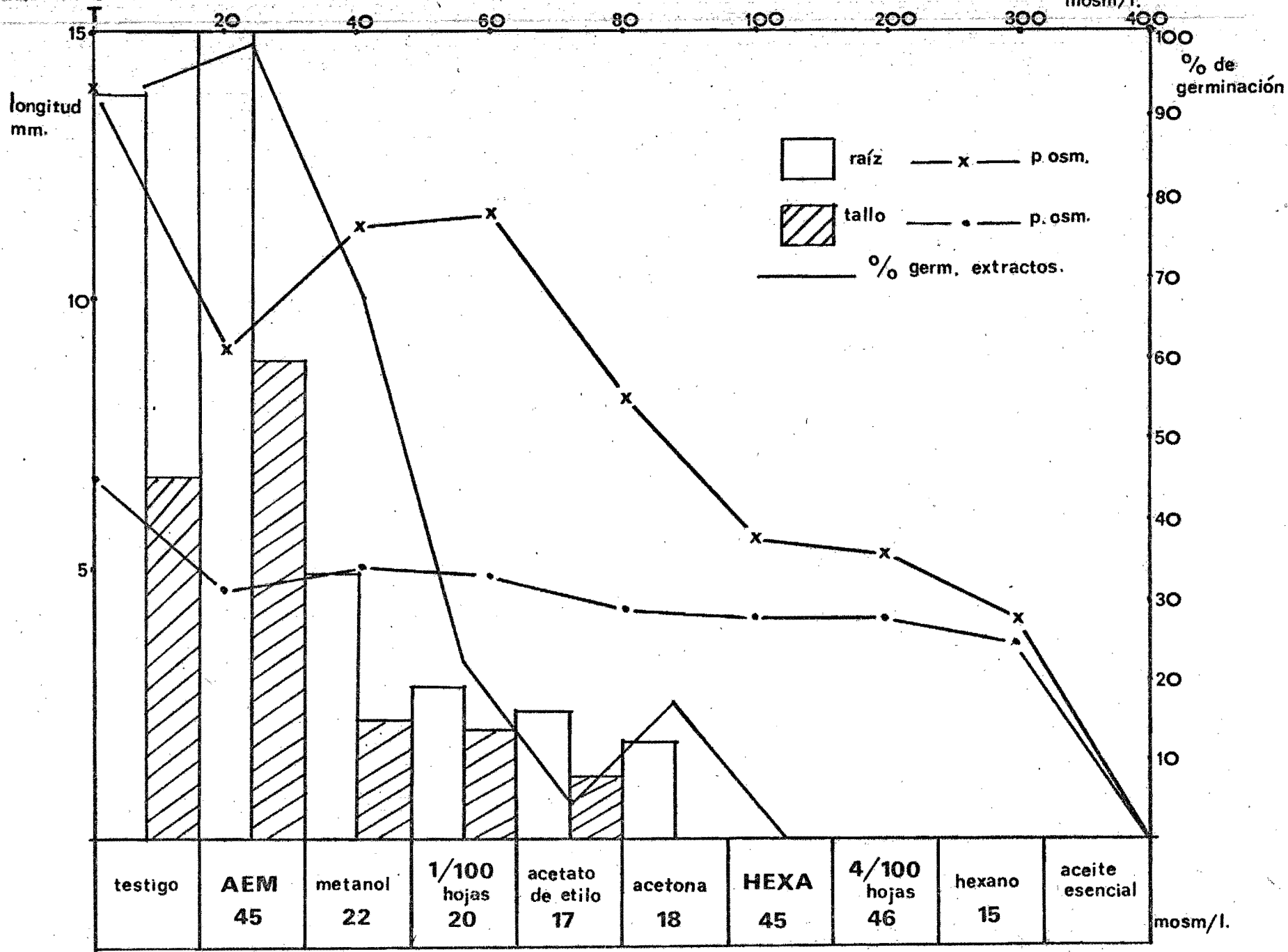


Fig. 2b. Achyrantes aspera. Reacción a diferentes extractos de Piper hispidum, comparada con el efecto de la presión osmótica. 120 hrs. de germinación.

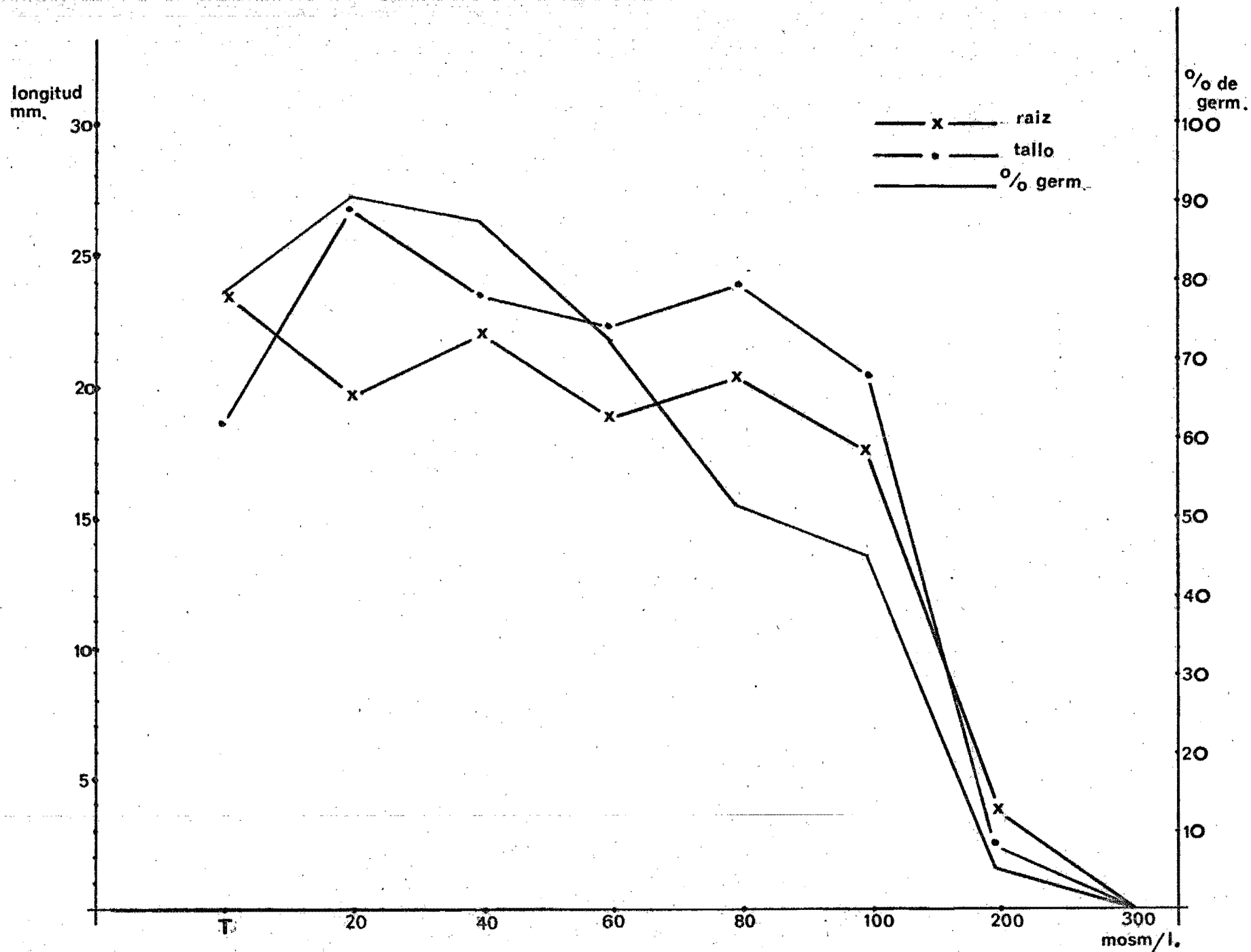


Fig. 3a. Bidens pilosa. Tolerancia a la presión osmótica. 120 horas de germinación.

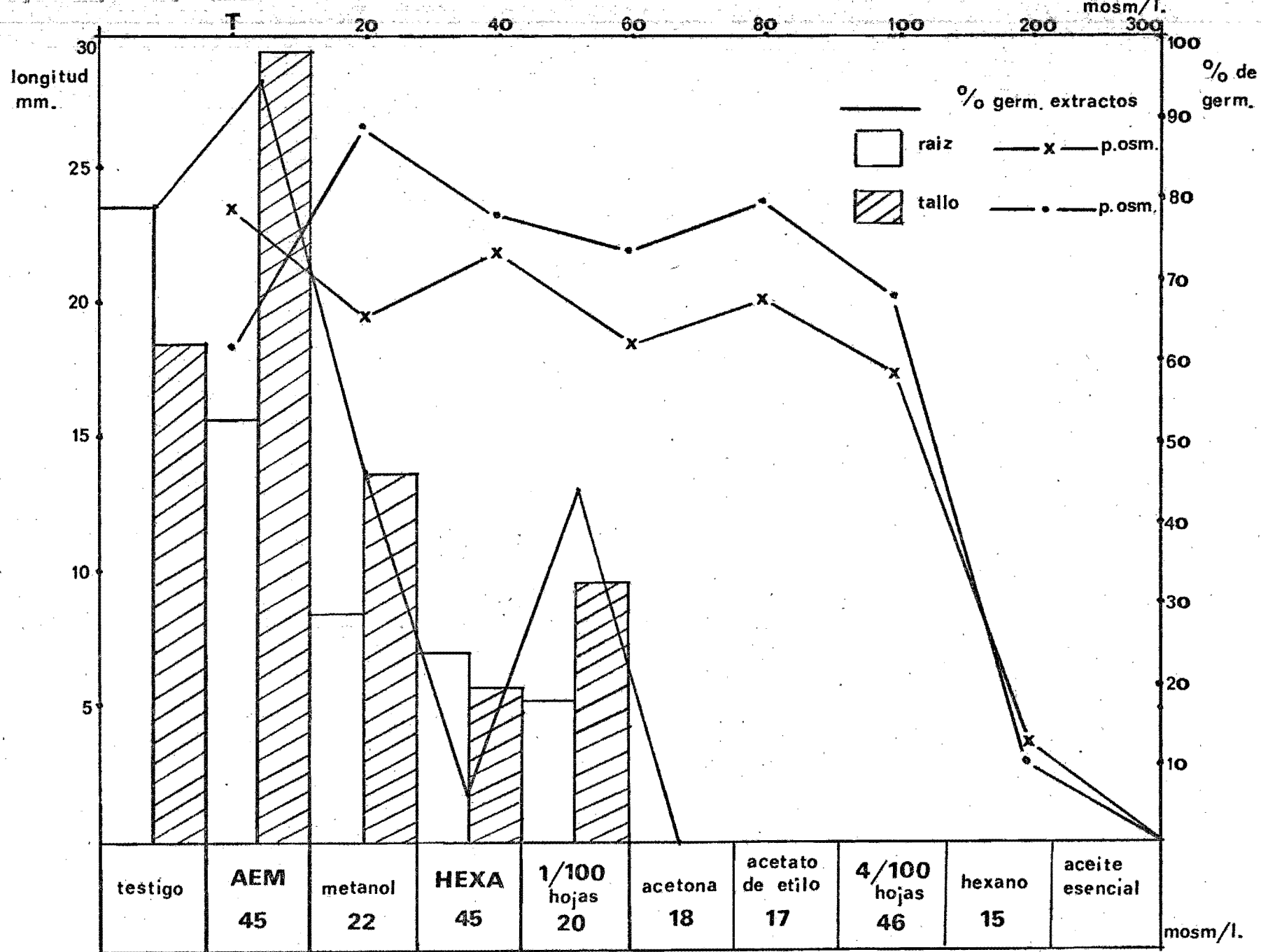


Fig. 3b.

Bidens pilosa. Reacción a diferentes extractos de Piper hispidum comparada con el efecto de la presión osmótica, 120 hrs. de germinación.

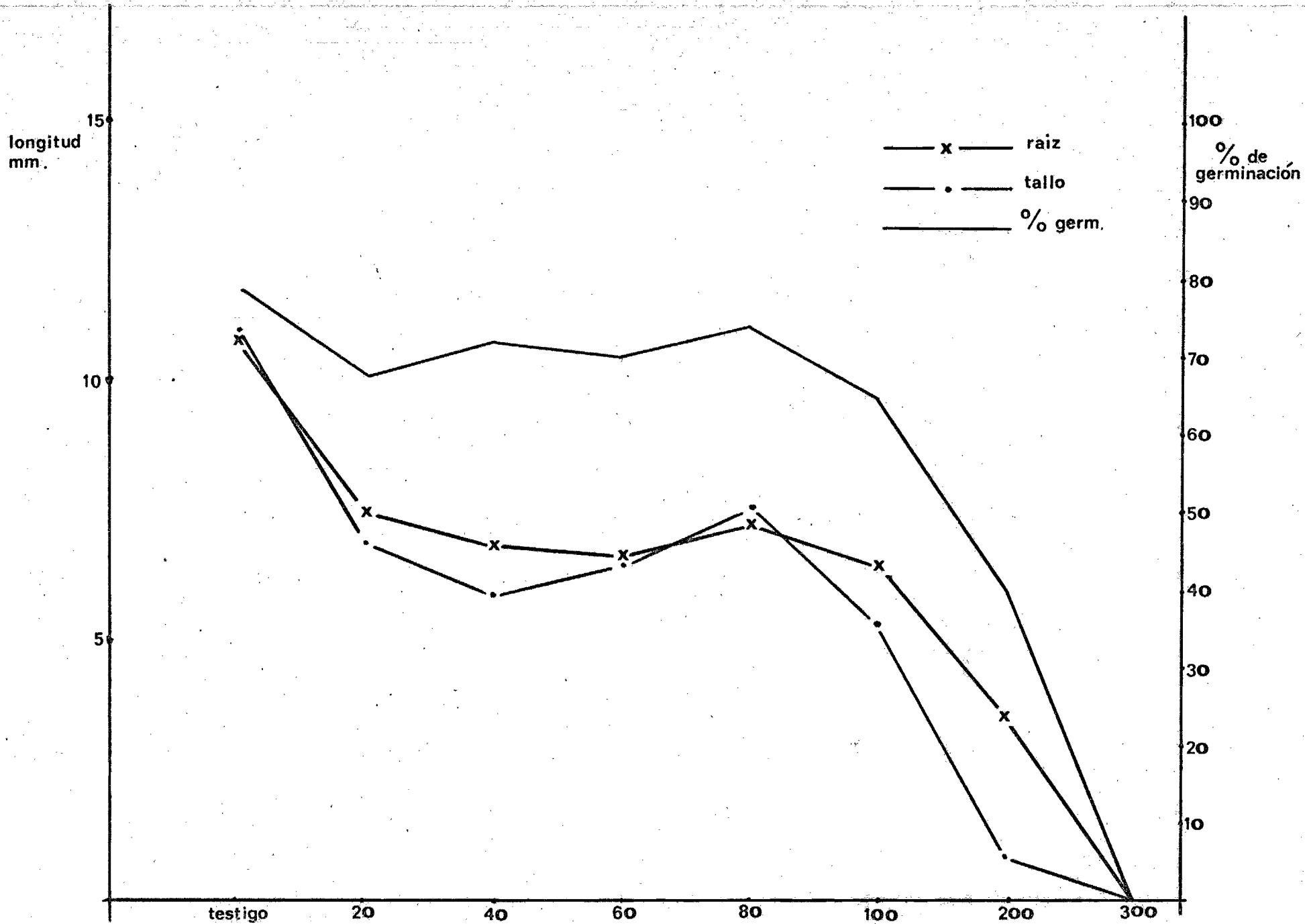


Fig. 4a. Heliocarpus donnell-smithii. Tolerancia a la presión osmótica, 120 hrs. de germinación.

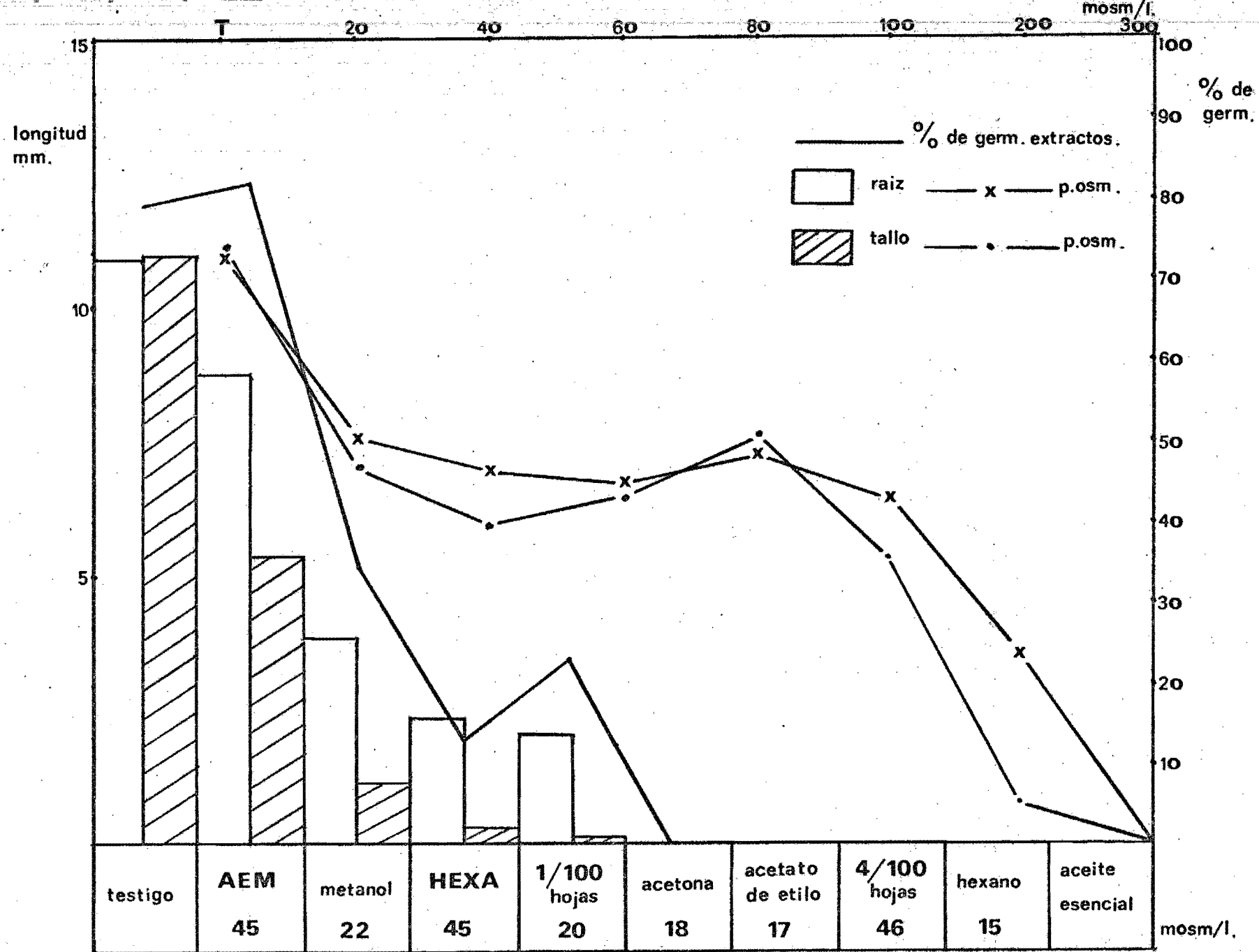


Fig. 4b. Heliocarpus donnell-smithii. Reacción a diferentes extractos de Piper hispidum comparada con el efecto de la presión osmótica. 120 hrs. de germinación.

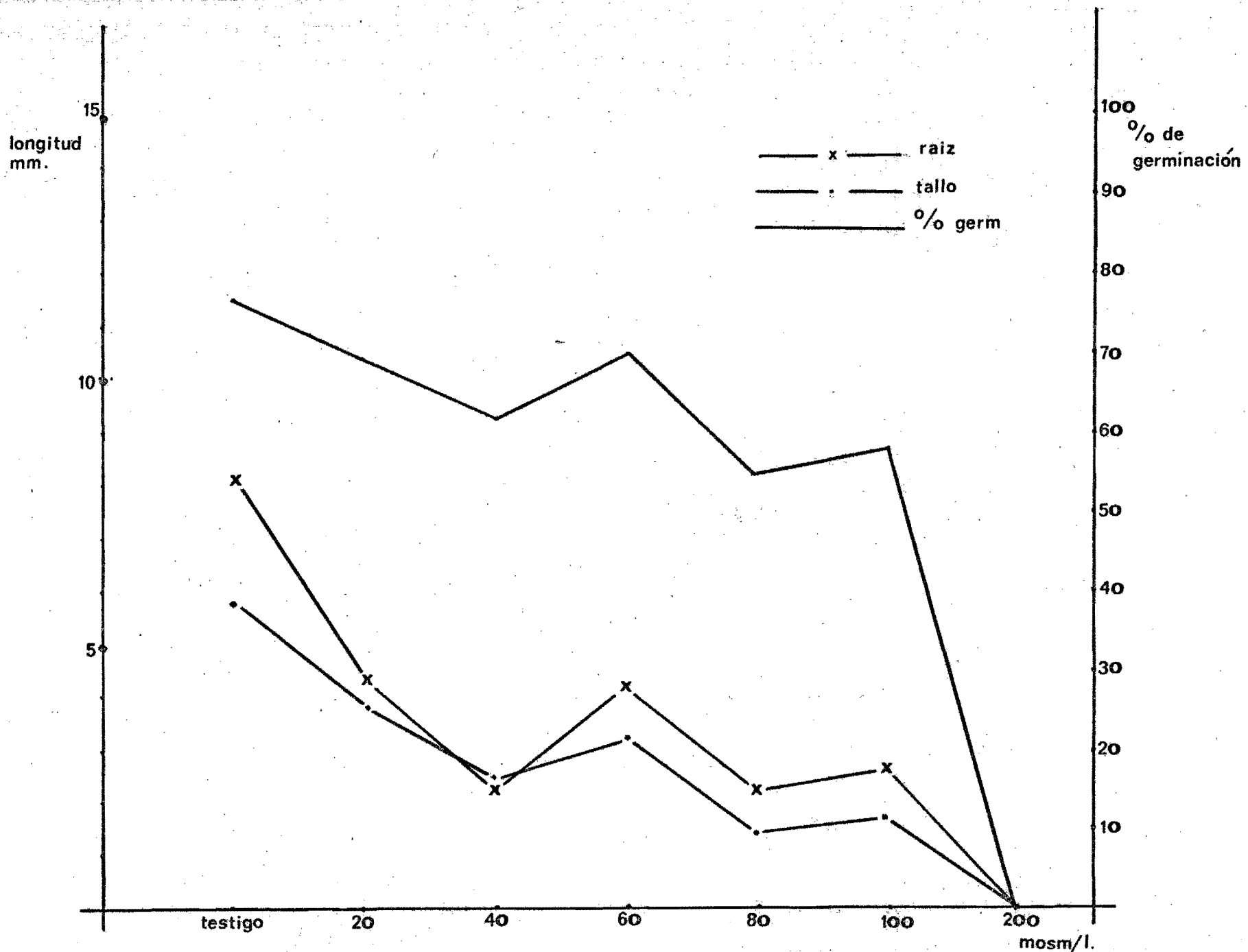


Fig. 5a. Solanum nitens. Tolerancia a la presión osmótica. 360 hrs. de germinación.

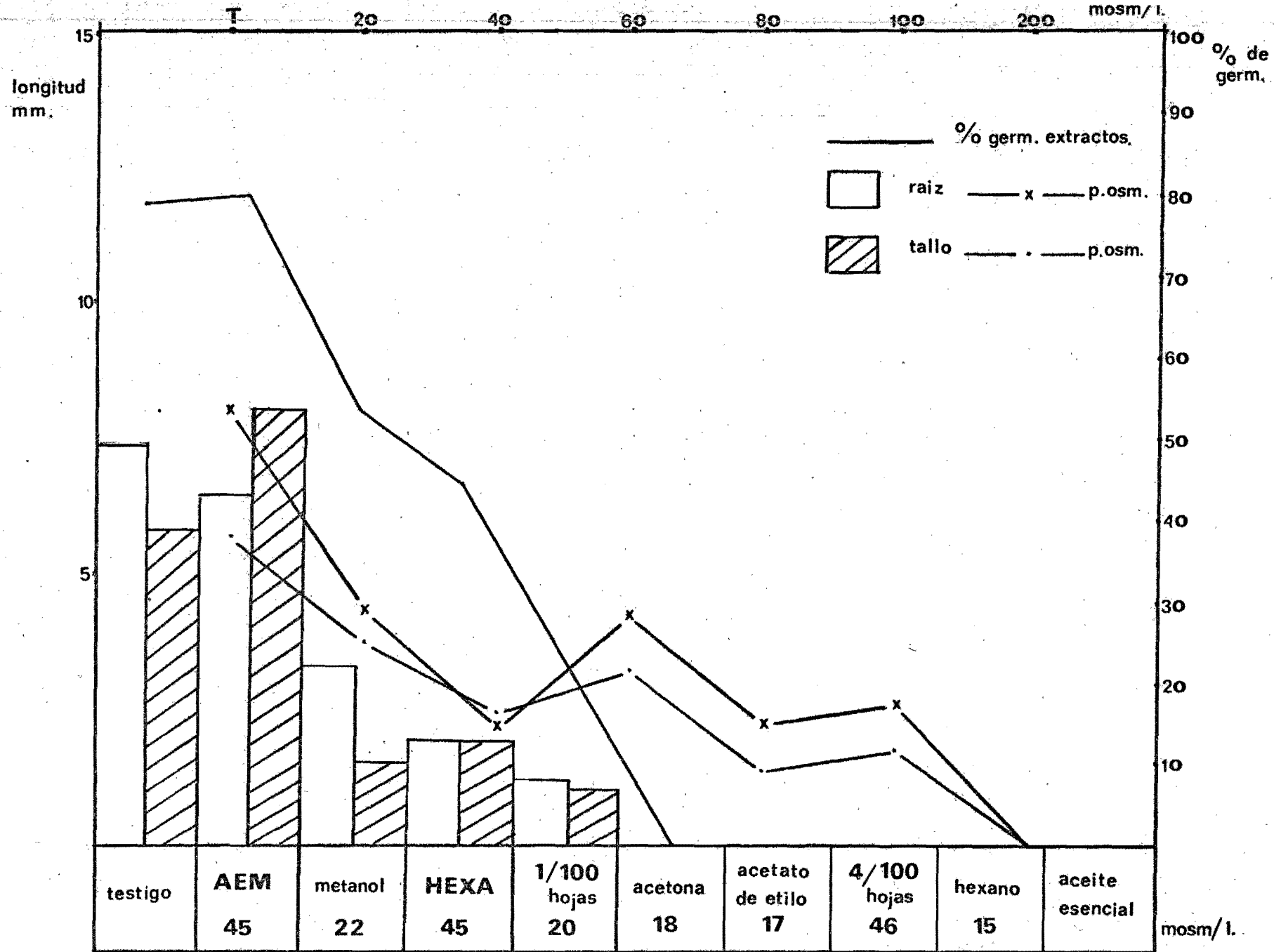


Fig. 5b. Solanum nitens. Reacción a diferentes extractos de Piper hispidum, comparada con el efecto de la presión osmótica. 360 hrs. de germinación.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La tolerancia a la presión osmótica fue diferente en cada una de las especies sometidas a experimentación. Achyranthes aspera fue la especie más resistente a este factor, y en orden decreciente le siguieron Bidens pilosa, Mimosa pudica, Heliocharis donnell-smithii y Solanum nitens. En Bidens pilosa, el crecimiento del tallo fue estimulado por todos los tratamientos de manitol, lo que podría explicarse por una probable necesidad de isotonicidad en el medio de cultivo para un desarrollo normal, ya que el sustrato natural no se encuentra libre de solutos; ó bien por un factor de compensación en la relación de longitud raíz-tallo al disminuir el crecimiento de la raíz. Solanum nitens fue la especie menos tolerante, puesto que fue la única que se afectó totalmente desde 200 mosm./l.

Las altas y bajas en las gráficas de crecimiento de la raíz y del tallo, así como en las de porcentaje de germinación con las diferentes concentraciones de manitol, indican que los valores de tolerancia no siguen una relación lineal inversa a medida que aumenta la osmolaridad, ya sea por la irregularidad en las respuestas de las especies de la vegetación secundaria bajo condiciones de laboratorio ó por adaptación de las mismas a diversos sustratos que presenten concentraciones osmóticas variables.

A excepción de Bidens pilosa, en la que el crecimiento del tallo sobrepasó el valor promedio del grupo testigo, en todas las espe-

cies se redujo significativamente la longitud de la raíz y del tallo en todos los gradientes osmóticos.

Como puede verse en los diferentes porcentajes de longitud de raíz y tallo respecto al grupo testigo (Tablas B y C), la reacción a los extractos de las hojas de Piper hispidum fue también desigual. La única especie que germinó y creció con todos los extractos fue Mimosa pudica, aunque no fue la especie más tolerante a la presión osmótica, lo cual indica que no existe relación entre el efecto de la misma y el de los extractos.

La germinación y el crecimiento en Achyranthes aspera fueron totalmente inhibidos por los extractos: a) acuoso del acetónico; b) acuoso del acetato de etilo; c) acuoso post hexano-acetona; d) acuoso de 4 g./100 ml. y e) aceite esencial.

Bidens pilosa, Heliocarpus donnell-smithii y Solanum nitens resistieron únicamente los siguientes extractos, en orden de menor a mayor inhibición: a) acuoso post acetato de etilo-metanol; b) acuoso del metanólico; c) acuoso post hexano-acetona y d) acuoso de 1 g. / 100 ml.

Estos resultados indican que hay cierta especificidad en la acción de la sustancia inhibidora, ya que por ejemplo, el extracto acuoso post hexano-acetona (HEXA) fue tóxico en un cien por ciento exclusivamente en Achyranthes aspera. En esta especie, el extracto acuoso post acetato de etilo-metanol (AEM) estimuló el crecimiento del tallo y de la raíz. En Bidens pilosa y en Solanum nitens estimuló únicamente el del tallo, pero no es posible deducir una acción es

pecífica de dicho extracto puesto que se desconoce su composición.

En las secuencias de extracción por solventes de menor a mayor polaridad, el acetato de etilo extrajo la mayoría de las sustancias inhibitoras en su secuencia, puesto que los extractos meta_nólico y acuoso fueron los de menor actividad. Todos los solventes de la secuencia hexano-acetona-agua destilada, extrajeron alguna sustancia tóxica, aunque en menor proporción que la secuencia anterior, y por los resultados obtenidos es probable que sea la misma que no se concentró totalmente en el hexano. La posibilidad de que fuese el hexano la sustancia responsable de la inhibición (fotografía # 6), dada su alta toxicidad y su dificultad de evaporación, se eliminó aplicando a las semillas el residuo acuoso de una mezcla de hexano al 1 %, desechando el solvente con un embudo de separación. Esta concentración era mayor de la que podría existir en el residuo vegetal y sin embargo, los resultados fueron similares a los del grupo testigo.

El aceite esencial fue el extracto más inhibitor en Mimosa pudica, (fotografía # 5) y debido a que ésta fue la especie más tolerante a los nueve extractos, podría pensarse que el aceite esencial fue también el extracto más tóxico para el resto de las especies; sin embargo, esto no puede afirmarse puesto que en éstas tanto el aceite esencial como los extractos acuoso post-hexano-acetona, acuoso del acetónico, acuoso de 4 g./100 ml., y acuoso del hexánico inhibieron completamente el crecimiento y la germinación. El efecto del aceite esencial puede tener significado desde el punto de vista

Mimosa pudica

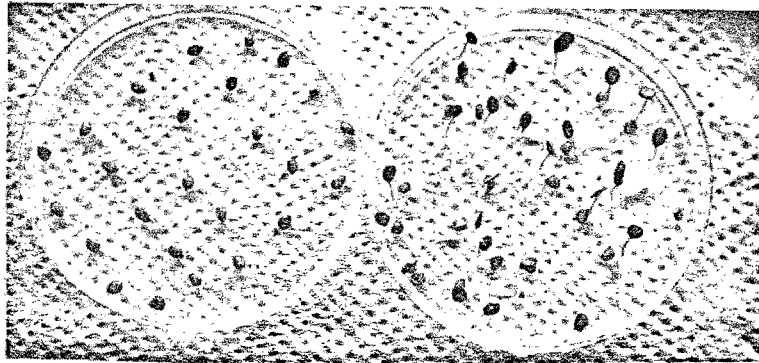


foto 5

efecto del
aceite esencial de testigo
hojas de P. hispidum



foto 6

efecto del extracto acuoso
del hexánico

ecológico, ya que la liberación del mismo junto con las sustancias químicas que posee, por arrastre con niebla o vapor de agua es una de las vías naturales de liberación de fitotoxinas. Las semillas previamente tratadas con aceite esencial se trasladaron posteriormente a agar puro, obteniéndose una completa recuperación en la germinación y el crecimiento. Este dato es importante ya que indica que las especies afectadas pueden desarrollarse normalmente una vez que hayan desaparecido las especies alelopáticas, y en este caso podría hablarse de un período de latencia impuesto por la inhibición química.

El efecto inhibitor de los extractos acuosos de 1 y 4 gramos de hojas revela la posible importancia ecológica de las fitotoxinas, ya que éstas parecen ser solubles en agua, ó por lo menos formar emulsiones con ella, y por lo tanto, pueden ser fácilmente liberadas al medio por las abundantes lluvias que se presentan en esa región.

La sustancia responsable de la inhibición es termoestable. lo cual pudo comprobarse al comparar el efecto de extractos acuosos a 20°C., con el de los mismos extractos solubilizados en agar a 60°C., no encontrándose ninguna diferencia entre ambos tratamientos. La extracción en el Soxhlet es otra prueba de la resistencia de la ó las fitotoxinas a las altas temperaturas, puesto que por bajo que haya sido el punto de ebullición de algunos solventes, como el hexano y la acetona, se obtuvieron extractos altamente inhibidores.

Una vez detectada la presencia de una o varias fitotoxinas activas en las hojas de Piper hispidum, y habiéndose comprobado que la presión osmótica no fue el factor responsable de la inhibición de

la germinación y del crecimiento en las especies experimentales, se tienen amplias bases para el estudio del fenómeno bajo condiciones naturales, lo que sería el siguiente paso en esta investigación, ya que la complejidad de las interacciones físicas, químicas y biológicas en el campo presenta un extenso tema de estudio ecológico.

BIBLIOGRAFIA.

- Anaya A. L., y A. Gómez-Pompa. 1969. Estudios de alelopatía en plantas superiores. Resúmenes del IV Congreso Mexicano de Botánica: 22. Monterrey, México.
- _____ y _____. 1971. Interacciones químicas entre plantas de diversas etapas sucesionales en una zona cálido-húmeda de México. Resúmenes del IV Simposio Latinoamericano de Fisiología Vegetal; 73. Lima, Perú.
- _____ y M. Rovalo. 1972. Alelopatía en plantas superiores: diferencias entre el efecto de la presión osmótica y los extractos acuosos alelopáticos sobre la germinación de algunas especies de la vegetación secundaria en una zona cálido-húmeda de México. En prensa.
- Baker, H. G. 1966. Volatile growth inhibitors produced by Eucalyptus globulus. Madroño. 18: 207-210.
- Bonner, J. 1950. The role of toxic substances in the interactions of higher plants. Bot. Rev. 16: 51-65.
- Côme, D. 1970. Les obstacles à la germination. Monographies de Physiologie Végétale. Masson et Cie., éditeurs. Paris. 162 p.
- Dotzenko, A. D., y J. G. Dean. 1959. Germination of six alfalfa varieties at three levels of osmotic pressure. Agron. J. 51: 308-309.
- Evenari, M. 1961. Chemical influences of other plants (allelopathy). Handbuch der Pflanzenphysiologie. 16: 691-763.

- _____. 1965. Light and seed dormancy. Handbuch der Pflanzenphysiologie. 15(2): 699-720.
- Flores, J. S. 1971. Estudio de la vegetación del Cerro "El Vigía" de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz. Tesis profesional. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. 93 p.
- Garb, S. 1961. Differential growth-inhibitors produced by plants. Bot. Rev. 27: 422-443.
- García, E. 1970. Los climas del estado de Veracruz. An. Inst. Biol. Univ. Nat. Autón. México. Ser. Botánica. 41(1): 1-42.
- Gómez-Pompa, A. 1966. Estudios botánicos en la región de Misantla, Veracruz. Tesis doctoral. Inst. Mex. Rec. Nat. Ren. México, D. F. 173 p.
- _____. 1971. Posible papel de la vegetación secundaria en la evolución de la flora tropical. Biotropica, 3(2): 125-135.
- _____. y C. Vázquez-Yanes. 1973. Estudios sobre la regeneración de las selvas altas perennifolias en Veracruz. Simposio sobre ecosistemas tropicales. AAAS. (en preparación).
- Gray, R., y J. Bonner. 1948. An inhibitor of plant growth from the leaves of Encelia farinosa. Amer. J. Bot. 35: 52-57.
- Grümmer, G. 1961. The role of toxic substances in the interrelationship between higher plants. Symp. Soc. Exptl. Biol., en Mechanisms in Biological Competition. Cambridge, Univ. Press. 15: 209-228.
- Knipe, D., y C.H. Herbel. 1966. Germination and growth of some semi

- grassland species treated with aqueous extracts from creosotebush. *Ecology*. 47(3): 775-781.
- Lawrence, J. M., y M. R. Kilcher. 1962. The effect of fourteen --- root extracts upon germination and seedling length of fifteen plant species. *Can. J. Plant Sci.* 42: 308-313.
- Le Tourneau, D., G. D. Failles y H. G. Heggeness. 1956. The effect of aqueous extracts of plant tissue on germination of .. seeds and growth of seedlings. *Weeds*. 4: 363-368.
- Mayer, A. M. y M. Evenari. 1953. The activity of organic acids as .. germination inhibitors and its relation to pH. *J. Expt. Bot.* 4: 257-263.
- y A. Poljakoff-Mayber. 1963. The germination of seeds. - Pergamon Press. Great Britain. 236 p.
- Moore, T. 1963. A germination inhibitor in achenes of Cercocarpus montanus. *Ecology* 44(2): 406-409.
- Müller, W. 1965. Volatile materials produced by Salvia leucophylla: effects on seedling growth and soil bacteria. *Bot. - Gaz.* 126(3): 195-200.
- Müller, C. 1966. The role of chemical inhibition (allelopathy) in ve getational composition. *Bull. Torrey Bot. Club.* 93(5): 332-351.
- Olmstead, C. E., y E. Rice. 1970. Relative effects of known plant in hibitors on species from first two stages of old-field succession. *Southw. Nat.* 15(2): 165-173.
- Pickering, S. V. 1919. The action of one crop on another. *Jour. Roy. Hort. Soc.* 43: 372-380.

- Rico, B. M., y A. Gómez-Pompa. 1973. Estudio de las primeras etapas sucesionales de una selva alta perennifolia en Veracruz, México. En prensa.
- Rudolfs, W. 1921. Effect of salt solutions having definite osmotic concentration values upon absorption by seeds. *Soil Sci.* 11: 277-293.
- Trelease, W. 1950. The Piperaceae of Northern South America. The Univ. of Illinois Press. U.S.A. Vol. I. 434 p. 393 fig.
- Tukey, H. B. 1969. Implications of allelopathy in agricultural plant science. *Bot. Rev.* 35(1): 1-16.
- Vázquez-Yanes, C. 1973. Estudios ecofisiológicos en semillas de especies de la vegetación secundaria en una selva tropical húmeda (manuscrito).
- Vogel, A. I. 1956. A text-book of practical organic chemistry, Longmans. 3^a. ed. 1188 p. Londres.
- Whittaker, R. H., y P.P. Feeny. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science.* 171: 757-770.
- Yardeni, D., y M. Evenari. 1952. The germination inhibiting, growth inhibiting and phytocidal effect of certain leaves and leaf extracts. *Phyton.* 2: 11-16.