

Efecto alelopático de un extracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de achicoria¹

Allelopathy effect of a *Raphanus sativus* L. chloroformic extract on the germination and plantles growth of chicory

S. Gianfrancisco^{2,3}, A. Pastoriza⁴, E. Riscalá⁵

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto alelopático de una fracción del sub-extracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. en semillas de achicoria (*Cichorium intybus* L.) a través de la determinación del porcentaje de germinación, la longitud de radícula e hipocótilo y el índice mitótico del meristema radicular. Plantas de *R. sativus* fueron recolectadas; se obtuvo un sub-extracto clorofórmico que luego fue procesado por cromatografía de columna y una fracción se seleccionó. Semillas de achicoria fueron germinadas en papel de filtro a concentraciones diferentes del sub-extracto: 250, 500, 1000 y 2000 ppm, agua y cloroformo como testigos e incubadas durante 72 h. Los datos fueron procesados por análisis de varianza, prueba medias de Tukey y análisis de regresión. Los porcentajes de germinación mostraron una marcada disminución con el incremento en la concentración del sub-extracto de *R. sativus* con diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el testigo agua y todas las concentraciones ensayadas. La misma respuesta fue encontrada para el índice mitótico. En todos los ensayos donde el sub-extracto fue usado, un porcentaje de semillas germinadas mostró geotropismo negativo en sus radículas, incrementando esta respuesta con el aumento de la concentración. En conclusión, una fracción del sub-extracto clorofórmico de *R. sativus* tiene efecto alelopático en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de achicoria.

Palabras claves: Alelopatía, geotropismo, germinación, índice mitótico, malezas.

Abstract

The objective of this paper was to evaluate the allelopathic effect of a fraction of *Raphanus sativus* sub-extract on chicory seeds (*Cichorium intybus* L.)

Recibido el 02-12-1997 • Aceptado el 17-06-1998

1. Trabajo de Investigación subvencionado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

2. Autor para correspondencia.

3. Cátedra de Fisiología Vegetal.

4. Cátedra de Genética.

5. Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán; Av. Roca 1900; C.P. 4000, San Miguel de Tucumán, Argentina.

through determination of percentage of germination, radicle and hypocotyl length and mitotic index in radicular meristem. Plants of *R. sativus* were collected; chloroformic sub-extract was obtained which was processed by column chromatography and a fraction was selected. Chicory seeds were germinated in paper filters at different concentrations of the extract: 250, 500, 1000 and 2000 ppm, and a water and chloroform control and incubated during 72 hs. Data were processed by analysis of variance, the Tukey test and regression analysis. The percentage of germination showed a marked decrease with the increase in concentration of *R. sativus* sub-extract with significant differences ($P < 0.05$) between water control and all concentrations of the sub-extract. The same response was found for mitotic index. In all assays where the extract was used, a percentage of germinated seeds showed negative geotropism in their radicles, and this response increased with the increase of the concentration. In conclusion, a fraction of *R. sativus* chloroformic sub-extract had allelopathic effects on the germination of seeds and growth of chicory plantules, due to the presence of groups carbonilos and hidroxilos that increase the fitotoxicity of the present metabolites in the same.

Key words: Allelopathy, geotropism, germination, mitotic index, weeds.

Introducción

Dentro de los mecanismos de interferencia en la evolución de las comunidades de plantas, existe competencia por luz, agua, nutrientes y suelo. Debe destacarse también la interferencia química o alelopatía, que ocurre cuando metabolitos producidos por una planta tienen efectos sobre el crecimiento de otras plantas. Se conoce que los productos alelopáticos pueden inhibir o estimular el crecimiento de otras plantas que crecen en su proximidad (4, 5, 10).

Existen publicaciones sobre el efecto alelopático producido por residuos de cosecha, en condiciones naturales (3, 5); sin embargo la mayoría de las investigaciones se realizan en situaciones artificiales, infiriendo la respuesta de las plantas a la presencia de sustancias elaboradas por otras. De esta manera se eliminan

algunas variables que podrían inducir a error en la interpretación de los resultados.

Muchas malezas de la familia Asteraceae presentan efecto alelopático sobre diferentes plantas cultivadas u otras malezas ya que producen lactonas sesquiterpénicas, las que afectan la síntesis de DNA y RNA, inhiben la germinación y el crecimiento de las plántulas, entre las principales interferencias citadas en la bibliografía (7, 8, 11).

La importancia de la interferencia alelopática está aún en discusión, posiblemente por la poca información disponible acerca de los mecanismos mediante los cuales la misma se ejerce. Reportes recientes indican que la fitotoxicidad de una molécula aumenta con la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos,

especialmente si estos últimos son a, b- insaturados (2, 9).

El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos alelopáticos sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Cichorium intybus* L.

(Asteraceae), aplicando diferentes concentraciones de una fracción de subextracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae), maleza difundida en la provincia de Tucumán, Argentina.

Materiales y métodos

Preparación y procesamiento del extracto de *Raphanus sativus* L. El material vegetal fue recolectado en estado de floración, en el camino de acceso a la localidad de San Pedro de Colalao, Tucumán, Argentina en marzo de 1997.

Previo a la preparación de los extractos se procedió a secar las plantas a temperatura ambiente y a la sombra. Posteriormente se separaron hojas y flores (180 g) y se realizaron extracciones con cloroformo (620 mL cada una), durante 7 días con agitación periódica. Se evaporó el solvente y el extracto crudo obtenido (9,3 g) fue suspendido en etanol 60° (120 mL), posteriormente se diluyó con agua (90 ml) y se extrajo sucesivamente con hexano (3 por 150 mL) y con cloroformo (3 por 150 mL). Ambos solventes fueron evaporados a presión reducida utilizando un rotaevaporador, obteniéndose los subextractos hexánico (SEH) y clorofórmico (SEC). Como resultado de esta partición los componentes polares se encuentran en el subextracto clorofórmico.

El SEC fue procesado mediante cromatografía en columna (sílica gel 60 g) y eluído con cloroformo y cantidades crecientes de acetato de etilo (0-90%). Se recolectaron 62 fracciones las que fueron monitoreadas por TLC usando

como patrones esteroides y triterpenos. La fracción N° 33 (84,5 mg) eluída de la columna con cloroformo-acetato de etilo 55:45, fue seleccionada para este trabajo, porque el espectro infrarrojo indica la presencia de: grupo hidroxilo (banda a 3350 cm^{-1}); carbonilo (banda a 1760 cm^{-1}) y carbono-hidrógeno (banda a 2900 cm^{-1}).

Alteraciones en el proceso de germinación. Se utilizaron semillas de achicoria cosechadas en el ciclo anterior, variedad comercial grano fino.

Se empleó el método de Kato (6) para estimar la germinación de las semillas; se impregnaron papeles de filtro (Watman GP) de 9 cm de diámetro colocados en cajas de Petri de vidrio, con 2 mL de soluciones clorofórmicas de 250, 500, 1000 y 2000 ppm de la fracción N° 33 del subextracto clorofórmico y se usaron como testigos agua bidestilada y cloroformo. Una vez evaporados los restos de solvente los papeles se imbibieron con 2 mL de agua bidestilada. Se colocaron 30 semillas en cada caja, utilizándose 3 repeticiones para cada concentración. Las semillas fueron distribuidas de manera uniforme en el papel. Todas las cajas de Petri se incubaron a 25°C y oscuridad por 72 h.

Se contó el número de semillas germinadas a las 24, 48 y 72 h,

mediéndose al cabo del tercer día, longitud radicular y de hipocótilo. Se observaron las anomalías radiculares presentes.

Los meristemas radiculares (a las 72 h) se fijaron en una solución de alcohol etílico y ácido acético en una proporción de 3:1 durante 24 h, hidrolizándose el material en ácido clorídrico 1 N a 60°C durante 3 minutos. Para realizar los preparados

se empleó hematoxilina al 2% como colorante y citrato férrico al 1% como mordiente (1), determinándose al microscopio óptico el índice mitótico (porcentaje de células en división celular sobre el total de células analizadas).

Los datos se procesaron estadísticamente, realizando el análisis de varianza, la prueba de medias de Tukey y análisis de regresión.

Resultados y discusión

En la figura 1 se expresa el porcentaje de semillas germinadas al cabo de 72 h. En comparación con los testigos se puede observar que la fracción del subextracto ensayada produce una marcada disminución en el número de semillas germinadas, siendo este efecto más intenso a medida que se incrementa la concentración de la misma.

En el cuadro 1 se presenta el análisis de varianza de los datos experimentales referidos al número de semillas germinadas.

La prueba de medias de Tukey, con un 95 % de certeza, muestra diferencias significativas entre el testigo de agua destilada y los tratamientos de 250, 500, 1000 y 2000 ppm de la fracción, lo que indica un

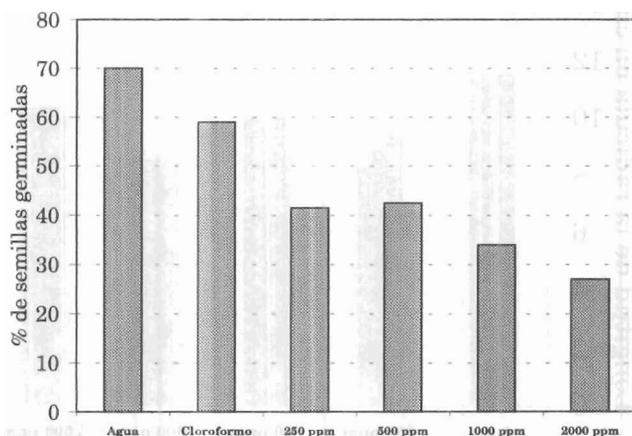


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de la fracción 33 del subextracto cloroformico de *Raphanus sativus* L. en el porcentaje de germinación de semillas de achicoria a las 72 h.

Cuadro 1. Análisis de varianza para el número de semillas de achicoria germinadas a las 72 horas.

Fuente de variación		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Fc
Total	20075,43	17	1180,908	
Tratamientos	5,1288	5	1,02576	0,000512
Bloques	39,0755	2	19,53775	0,009754
Error experimental	20031,23	10	2003,123	

marcado efecto depresor de la misma en el número de semillas de achicoria germinadas a las 72 h. Si los resultados se expresan como porcentaje de semillas germinadas respecto al testigo agua (100%), la concentración de 250 ppm alcanza valores del 58%, éste disminuye progresivamente con el aumento de la concentración del subextracto, germinando sólo el 39% de las semillas a 2000 ppm. Esta marcada tendencia en la disminución de las semillas germinadas en forma dependiente de la concentración de la sustancia ensayada, concuerda con los

resultados obtenidos por otros autores para *Lactuca sativa* (8), *Brassica campestris* L. (7), usando metabolitos producidos por vegetales, de marcado efecto alelopático.

En la figura 2 se analizan los datos correspondientes a la longitud radicular a las 72 h. Los resultados indican una leve disminución en la longitud de las radículas provenientes de semillas sometidas a la acción de la fracción ensayada con respecto al testigo agua, pero no hay variaciones importantes ocasionadas por las distintas concentraciones utilizadas.

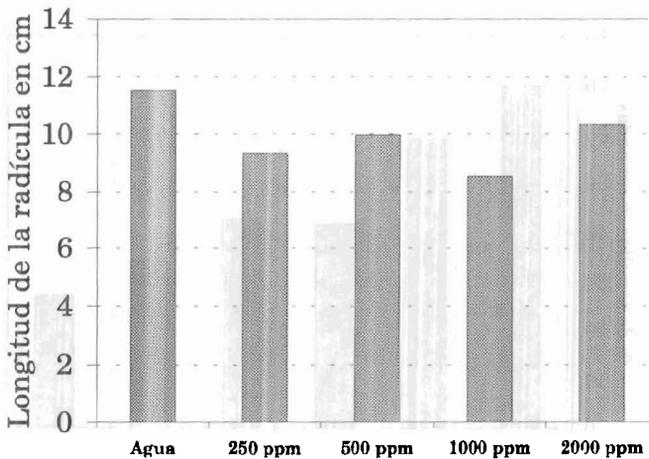


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de la fracción 33 del subextracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. sobre la longitud radicular de achicoria a las 72 h.

El análisis de varianza no indica diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Con respecto a la longitud del hipocótilo a las 72 h, los resultados se muestran en la figura 3. Las variaciones observadas en la longitud del hipocótilo para las diferentes concentraciones de la fracción ensayada, respecto al testigo agua, son poco notables. El análisis de varianza no muestra diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Koitabashi *et al.* (7), indicando que la mayoría de las sustancias con efecto alelopático actúan principalmente a nivel de crecimiento de la radícula, mientras que la longitud del hipocótilo permanece sin grandes modificaciones.

Se debe destacar que en todos los tratamientos con la fracción del SEC de *Raphanus sativus* L., un porcentaje de las semillas germinadas presentaba radículas con geotropismo negativo, aumentando el mismo a medida que

se incrementaba la concentración, como se observa en la figura 4. A pesar que el porcentaje de radículas que presentaban este efecto es pequeño en semillas germinadas a 250, 500 y 1000 ppm, tiene valores considerables (51%) cuando se aplican concentraciones de 2000 ppm.

Respecto al índice mitótico calculado para achicoria, los valores se observan en el cuadro 2, mostrando una marcada disminución de las células en división con respecto al testigo, a medida que aumenta la concentración de la fracción en estudio.

El análisis de la regresión efectuado para el índice mitótico, indica una correlación lineal entre las variables, con un $r^2 = 73,56\%$ y un $r = -0,85$.

Los resultados indican una disminución marcada en la división celular, coincidentes con lo descrito por Koitabashi *et al.* (7) en *Brassica campestris* L. en referencia al descenso del índice mitótico en ápices

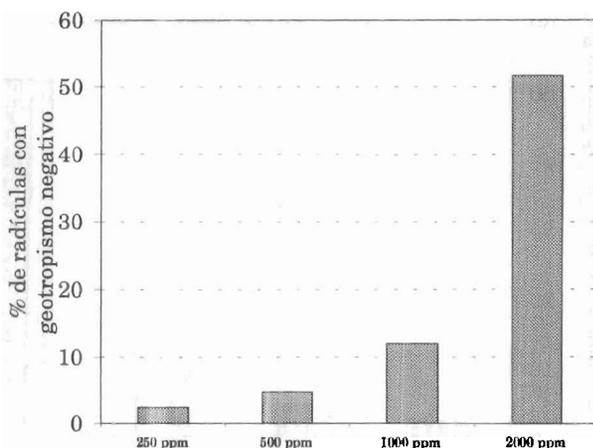


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de la fracción 33 del subextracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. en la longitud del hipocótilo de achicoria a las 72 h.

Cuadro 2. Índice mitótico radicular en achicoria, para las diferentes concentraciones de la fracción 33 del subextracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L.

Tratamiento	Células en división	Células en interfase	Índice mitótico
Testigo agua	155	898	14,7
250 ppm	101	1053	9,6
500 ppm	88	1061	8,3
1000 ppm	50	1131	4,5
2000 ppm	39	996	3,9

radiculares. A pesar de ello, este efecto no se manifiesta en la longitud de la radícula de achicoria, como se analizó anteriormente (figura 2). Por ello podemos inferir que la longitud de la radícula estaría más influenciada durante el período de la experiencia por el alargamiento de las células que por el número de células formadas.

Del análisis de los resultados de la influencia de la fracción 33 del subextracto de *R. sativus* ensayado sobre semillas de achicoria, puede concluirse que posee un efecto depresor

en el porcentaje final de semillas germinadas, con diferencias significativas en todas las concentraciones respecto al testigo agua. Si a este hecho se suma el geotropismo negativo que presentaban algunas de las radículas, puede inferirse que la acción alelopática del subextracto de *R. sativus* sobre la cantidad de plantas de achicoria que pueden establecerse es muy marcado, produciendo indudablemente una notable disminución en el número de plantas finales.

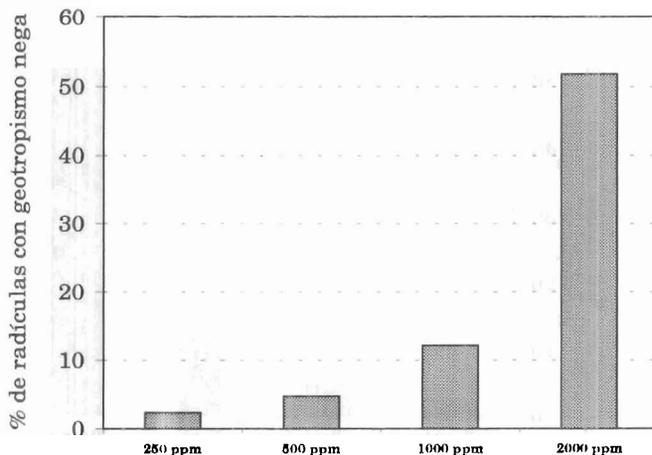


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de la fracción 33 del subextracto clorofórmico de *Raphanus sativus* L. sobre el geotropismo de radículas de achicoria.

En coincidencia con los trabajos de Baruah *et al.* (21) y Macías *et al.* (9), la actividad biológica descrita se atribuye a las características químicas de la fracción del subextracto ensayado,

en particular a la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos que incrementan la fitotoxicidad de los metabolitos elaborados por vegetales.

Literatura citada

1. Andrada, A. B., A. J. Boggiatto, L. G. Auad y M. Collado. 1975. Estudios citogenéticos en el híbrido intergenérico *Euchlaena perennis* Hitch. por *Zea mays* L. I. Análisis mitótico en plantas de dos generaciones. R.A.N.A. 12 (3-4): 323-330.
2. Baruah, N. C., J. C. Sarma, N. C. Barua, S. Sarma and R. P. Sharma. 1994. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and flavones from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* 36 (1): 29-36.
3. Cope, W. A. 1982. Inhibition of germination and seedling growth of eighth forage species by leachates from seed. *Crop Sci.* 22:1109-11.
4. Einhelling, F. A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. p.171-188. In: *The Science of allelopathy*. A.R. Putnam and C. S. Tang (eds) John Wiley and Sons. New York.
5. Hoffman, M. L., L. A. Weston, J. C. Snyder and E. E. Regnier. 1996. Allelopathic influence of germinating seed and seedlings of cover crops on weed species. *Weed Science* 44:579-584.
6. Kato, T., M. Tsunakawa, N. Sasaki, H. Aizawa, K. Fujita, Y. Kitahara and N. Takashi. 1977. Growth and Germination Inhibitors in Rice Husks *Phytochemistry* 15 (1): 45.
7. Koitabashi, R., T. Suzuki, A. Sakai, H. Kuroiwa and T. Kuroiwa. 1997. 1,8 cineole inhibits roots growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research* 110:1-6.
8. Krautmann, M., A. Marchese, A. Pastoriza y E. Riscalá. 1997. Efectos de *Psilotachyna* sobre la germinación de *Lactuca sativa*. En prensa. *Rev. Latinoamericana de Malezas (ALAM)*.
9. Macías, F. A., J. M. G., Molinillo, A. Torres, R. M. Varela and D. Castellano. 1997. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry* 45: 683-687.
10. Moyer, J. R. and H. C. Huang. 1997. Effect of aqueous extracts of crop residues on germination and seedling growth of ten weed species. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38:131-139.
11. Tang, C. S. and C. C. Young. 1982. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of bigalga limpgrass. *Plant Physiology* 69:155-160.