



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUIMICO
FARMACOBIOLOGIA**

**COMPOSICION QUIMICA Y POTENCIAL
ALELOPATICO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Eupatorium glabratum KUNTH (CEDAZO) DE
LLANO DE PARIO MICHOACAN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:
ERIC MARK RIOS RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
D.C. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA**

Morelia, Michoacán, Febrero 2010.

INDICE

I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6
III. ANTECEDENTES	8
3.1 Metabolismo secundario.....	8
3.2 Alelopatía.....	9
3.2.1 Alelopatia elemental	9
3.3 Demostración de alelopatia.....	11
3.4 Liberación de aleloquímicos a la atmósfera.....	11
3.4.1 Volatilización.....	11
3.4.2 Lixiviación	12
3.4.3 Exudación	12
3.4.4 Descomposición de la materia orgánica	12
3.5 Mecanismos de acción de los alelopáticos.....	13
3.5.1 Efectos indirectos.....	13
3.5.2 Efectos directos.....	14
3.5.2.1 Cloroplastos (fotosíntesis).....	15
3.5.2.2 Mitocondria (Interrupción de respiración oscura y síntesis de ATP).....	15
3.5.2.3 Especies reactivas de Oxígeno intermediadas por mecanismos	
alelopáticos.....	16
3.6 Mecanismos de resistencia a aleloquímicos.....	17
3.7 Evidencias de Alelopatia.....	18
3.8 Sucesión secundaria.....	19
3.8.1 Sucesión secundaria en ambientes productivos.....	20
3.8.2 En ambientes improductivos.....	21
3.9 Composición química del género <i>Eupatorium</i>	22
3.9.1 Usos medicinales del genero <i>Eupatorium</i>	23
3.9.2 <i>Eupatorium glabratum</i> Kunth.....	23
3.10 Métodos de extracción y análisis.....	25
3.10.1 Cromatografía.....	25
3.10.2 Espectro de masas.....	26
IV. HIPOTESIS.....	27
V. OBJETIVOS.....	27

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Material biológico.....	28
6.2 Extracción del aceite esencial.....	29
6.3 Extracción de los componentes del agua de arrastre de vapor.....	30
6.4 Análisis químico.....	30
6.5 Bioensayos.....	31
6.5.1 Aceite Esencial/ Fracción hidrofóbica.....	31
6.5.1.1 Germinación y desarrollo de semillas expuestas a fracción hidrofóbica del aceite esencial.....	31
6.5.1.2 Desarrollo y crecimiento temprano de radícula e hipocótilo expuestos a fracción hidrofóbica del aceite esencial.....	32
6.5.2 Agua de arrastre (A.Arr)/ Fracción hidrofílica.....	32
6.5.2.1 Germinación y desarrollo de semillas expuestas a fracción hidrofílica del aceite esencial.....	32
6.5.2.2 Desarrollo y crecimiento temprano de radícula e hipocótilo expuestos a fracción hidrofílica del aceite esencial.....	33
6.5.2.3 Análisis estadístico.....	33
VII RESULTADOS.....	35
7.1 Análisis químico del aceite esencial de hojas de <i>Eupatorium glabratum</i> Kunth.....	35
7.1.1 Análisis químico de fracción hidrofóbica.....	36
7.1.2 Análisis químico de fracción hidrofílica.....	38
7.2 Bioensayos.....	40
7.2.1 Fracción hidrofóbica.....	40
7.2.1.1 Efecto de la fracción hidrofóbica del aceite esencial sobre semillas y plántulas de <i>Lactuca sativa</i>	40
7.2.1.2 Efecto de la fracción hidrofóbica del aceite esencial de <i>E. glabratum</i> sobre semillas y plántulas de <i>Pinus oocarpa</i>	50
7.2.1.3 Efecto de la fracción hidrofóbica del aceite esencial de <i>E. glabratum</i> sobre semillas y plántulas de <i>Lupinus elegans</i>	60
7.2.2 Fracción hidrofílica/ Agua proveniente de arrastre de vapor (A.Arr).....	69
7.2.2.1 Efecto de la fracción hidrofílica (A.Arr) del aceite esencial sobre semillas y plántulas de <i>Lactuca sativa</i>	69
7.2.2.2 Efecto de la fracción hidrofílica del aceite esencial sobre semillas y plántulas de <i>Pinus oocarpa</i>	74

7.2.2.3 Efecto de la fracción hidrofílica del aceite esencial sobre semillas y plántulas de <i>Lupinus elegans</i>	76
VIII. DISCUSION.....	79
IX. CONCLUSIONES.....	83
X.BIBLIOGRAFÍA.....	84

I. RESUMEN

Se identificaron químicamente algunos de los componentes mayoritarios de la fracción hidrofóbica, y de la fracción hidrofílica del aceite esencial de las hojas de *Eupatorium glabratum* Kunth colectadas en el paraje “El llano de Pario” uno de los sitios afectados por las erupciones del volcán Parícutín. Ahí se formaron capas profundas de tephra o arena volcánica. En los arenales, *E. glabratum* se ha establecido de manera dominante, y se sospecha que interfiere con la sucesión secundaria y el establecimiento de algunas especies nativas como *Lupinus elegans* y especies del género *Pinus*. Una de las posibilidades es que la interferencia sea causada por *E. glabratum* mediante compuestos alelopáticos volátiles o lixiviados que afecten la germinación o el desarrollo de las plántulas. Para analizar estos componentes se extrajo el aceite esencial de las hojas de *E. glabratum*, mediante destilación por arrastre de vapor, de la cuál se desprendieron dos fracciones: hidrofóbica e hidrofílica que posteriormente se analizaron mediante Cromatografía de gases- espectrofotometría de masas. Los componentes de la parte hidrofóbica del aceite esencial que se encontraron puros y que se identificaron fueron: 1R- α -pineno, camfeno, β -pineno, α -felandreno, *p*-cimeno, D-limoneno, 2- bornil acetato, α - cubeneno, β -baubareno, cariofileno, L- aloaromandreno, de los cuáles cuatro de ellos ya habían sido reportados como alelopáticos. De la fracción hidrofílica sólo tres de los cinco compuestos puros se identificaron: ácido isobutírico, fenil metanol y α - terpineol. Se realizaron bioensayos en los que semillas y plántulas de *Lactuca sativa* var. *longifolia*, *Lupinus elegans* y *Pinus oocarpa*, fueron expuestas a diferentes concentraciones de ambas fracciones del aceite esencial. En cada bioensayo se midió tasa de germinación, desarrollo y crecimiento temprano de dichas especies, y los datos obtenidos se analizaron con análisis de varianza paramétrico y no paramétrico (Kruskall-Wallis). Los resultados mostraron que las fracciones hidrofóbica e hidrofílica contienen aleloquímicos capaces de inhibir el desarrollo de *L. sativa*, así como de *P. oocarpa* y *L. elegans* aunque en menor proporción. La fracción hidrofóbica inhibe el desarrollo y crecimiento temprano de las tres especies a rangos de dosis de 0.1-1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. La fracción hidrofílica inhibe la germinación y desarrollo de *L. sativa* en medios de cultivo donde el sustrato este diluido con la fracción hidrofílica a concentraciones de 3:1, 2:1 y 1:1.

II. INTRODUCCIÓN

Dentro de las relaciones planta-planta la interacción más importante sin duda es la competencia ya que las plantas son obligadas a compartir muchos de los recursos del hábitat, tales como espacio, nutrientes, luz, agua, e incluso polinizadores. De tal forma que cualquier ventaja que pudiera obtener una de ellas sobre la(s) otra(s) en la utilización de algún recurso con mayor efectividad y con mayor poder ofensivo, puede decidir al cabo de un tiempo el desplazamiento o eliminación de la(s) otra(s) planta(s).^(4 y 6) Un tipo de interacciones, que comúnmente suele confundirse con competencia, son aquellas en las que se involucran metabolitos secundarios (MS), que ocurre cuando la planta libera al medio uno o una mezcla de ellos, con diferentes funciones tales como intercambio de información, polinización, defensa contra herbívoros, o contra otras plantas con quienes coexiste; este último fenómeno, que es conocido como aleopatía^(4 y 6). La liberación de los aleloquímicos al ambiente se da mediante los siguientes mecanismos: volatilización, principalmente de las hojas, lixiviación o lavado de las partes aéreas o raíces de las plantas, por medio de la lluvia, el rocío o la niebla, exudación a través de las raíces o descomposición de la materia orgánica por microorganismos^(4,6,21,35 y 38). La liberación depende de la naturaleza química del MS de los que hasta hoy se han descrito un poco más de 100,000 estructuras⁽³⁸⁾. Esta diversidad obedece al amplio rango de características químicas que son resultado de las tres rutas biosintéticas principales: 1.-Ruta del ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos; 2.-Ruta de los aminoácidos, que dan origen a los alcaloides y antibióticos 3.- Ruta del acetato, precursor de los poliacetilenos^(6 y 12). A pesar de esta heterogeneidad solo algunos cuantos de ellos han sido identificados claramente como alelopáticos³³

Aunque no se ha prestado la suficiente atención a este fenómeno, existen evidencias de campo sobre efectos adversos de una planta a otra en diferentes hábitats, como es el caso de los chaparrales costeros australianos donde se encuentra *Eucalyptus baxteri* el cuál, bajo su copa, inhibe el crecimiento de algunas especies simpátricas^(18 y 19). Otro caso convincente de aleopatía fue el que se presentó en California, donde Del Moral (1969) y Müller (1970) demostraron el efecto alelopático de *Eucalyptus camaldulensis* Denh, sobre especies anuales de pastizales adyacentes a los eucaliptos, donde además de observar zonas desnudas de vegetación cerca de los árboles, también documentaron gradientes de escasez-abundancia e incremento de biomasa a medida que se incrementaba su lejanía de los troncos del eucalipto.^(18 y 19)

En ambos casos de eucaliptos se determinó que no existían diferencias en el contenido de humedad, cantidad de iluminación y nutrientes bajo la copa de estos con respecto a los de otros arbustos donde no había inhibición otras especies. Además demostraron también mediante bioensayos que tanto los lixiviados como los extractos de hojas de los eucaliptos en cuestión, inhibieron la germinación y crecimiento de las especies vecinas¹⁵.

Centaurea maculosa miembro de la familia de las compuestas conocida por su potencial alelopático es una de las malezas invasoras más destructivas del oeste de Estados Unidos particularmente en pastizales; el componente mayoritario secretado de raíces de esta planta es (-)-catequina, aleloquímico que ha mostrado actividad citotóxica de amplio espectro a dosis de 10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre especies como: *Festuca idahoensis*, *Koeleria cristata* y *Papavar orientale* entre otras^(10 y 43).

Es posible que la alelopatía ocurra en el paraje denominado “Llano de Pario”, un arenal remanente de la erupción del volcán Parícutín, ubicado en el municipio de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, 8 km al norte de la cabecera municipal. En este lugar, el cedazo o hierba de mula (*Eupatorium glabratum*) domina el paisaje, junto con tres especies herbáceas que se encuentran en menor proporción, con una distribución en forma de parches o manchones^(3,23,30 y 31). Se sospecha que *E. glabratum* es el causante de que *Lupinus elegans* no logre establecerse en el sitio, leguminosa que interviene en la fijación de nitrógeno en el suelo²³, lo cuál favorece el desarrollo de algunas especies del género *Pinus*: *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* y *P. oocarpa*.

Se ha observado que en este sitio *E. glabratum* comúnmente se establece en la base de algún pino muerto donde solo pocas especies herbáceas crecen alrededor formando parches en donde no crece nada interrumpiendo el pastizal de tal forma que solo se observa el suelo cubierto de arena volcánica, patrón que se observa en la mayor parte de este ecosistema. También se ha observado que *E. glabratum* desprende un fuerte aroma de sus partes aéreas, característica alelopática y una posible causa del dominio que el cedazo ha tenido en esta zona.

En este trabajo evaluamos la composición del aceite esencial de *E. glabratum* y su potencial alelopático sobre la germinación y crecimiento temprano de *Lupinus elegans* y *Pinus oocarpa*.

III. ANTECEDENTES

3.1 Metabolismo secundario

Las plantas producen una gran cantidad de compuestos orgánicos, cuya mayoría no parecen participar en el crecimiento y desarrollo de éstas¹². Estos compuestos que son producidos paralelamente a los metabolitos primarios (aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) a través de las mismas o similares vías de biosíntesis pero por sus características particulares y específicas se denominan compuestos o metabolitos secundarios (MS). Los principales grupos de MS son: ácidos fenólicos, flavonoides y otros compuestos aromáticos, terpenoides, esteroides, alcaloides y cianuros orgánicos^(6 y 12). Estos compuestos tan ubicuos, son los componentes presentes en esencias, sabores, especias y otras características organolépticas, y que aparentemente no tienen función en el metabolismo primario de los organismos que las producen, pero son esenciales para su sobrevivencia^(6 y 12).

Por su reactividad, los MS tienen la capacidad de interactuar en organismos vivos y afectar varios procesos fisiológicos al ingresar en ellos⁵, capacidad que funciona en las plantas como defensa contra sus enemigos naturales. Algunos estudios sugieren que una alta diversidad de MS en mezcla y en altas concentraciones son más efectivos contra patógenos que un solo compuesto, o que una menor diversidad de compuestos en mezcla tanto a bajas como a altas concentraciones^(5 y 26).

El amplio rango de características químicas en los metabolitos secundarios deriva de un grupo de precursores sorprendentemente reducido, cuyos principales grupos son:

1.- El ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos incluyendo los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y algunos polifenoles.

2.- Los aminoácidos, que dan origen a los alcaloides y a los antibióticos peptídicos como las penicilinas y las cefalosporinas.

3.- El acetato, precursor de poliacetilenos, prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles e isoprenoides (terpenos, esteroides y carotenoides), a través de dos vías biosintéticas totalmente separados^(4,6 y 12). La ruta más diversa es la del ácido shikímico seguida por la del acetato⁴

Los precursores de los MS también son utilizados para la biosíntesis de ciertos metabolitos primarios: proteínas, ácidos grasos, lípidos, etc. Es importante señalar que las

reacciones biológicas involucradas en la síntesis de los metabolitos primarios y secundarios están catalizadas por muchísimas enzimas diferentes y que en principio son reversibles. ^(6 y 12)

3.2 Alelopatía

El termino “alelopatía” fue usado por primera vez por Molisch (1937) para definir la interacción química entre plantas en la cual una especie, planta donadora, libera al medio a través de diferentes tejidos uno o varios metabolitos secundarios provenientes de alguna de sus rutas biosintéticas, afectando con ellos a otra planta. El término alelopatía es frecuentemente utilizado para describir efectos fitotóxicos, entre los que destacan la reducción en la germinación de semillas desarrollo y en el crecimiento de la planta. En sistemas forestales, la alelopatía puede afectar varios aspectos del ciclo ecológico como: sucesión de plantas, estructura de comunidad de plantas, dominancia, diversidad y productividad ^(4,6,13,15,18,35,36 y 45). Aunque el término alelopatía es comúnmente usado para definir la interacción química planta-planta, también ha sido utilizado para describir comunicación química microbio-microbio, planta-microbio y planta-herbívoro, incluyendo los efectos tóxicos y benéficos. En plantas los compuestos aleoquímicos pueden estar presentes en hojas, corteza, raíz, flores y frutos, así como dentro de los microorganismos. Estos compuestos pueden ejercer su efecto por medio de su estructura original, o bien pueden constituirse como precursores de diferentes compuestos tóxicos o benéficos que se producen durante la descomposición microbiana de la materia orgánica ^(4,6,35,42 y 45).

En la alelopatía, el efecto sobre un organismo se ejerce a través de la liberación al medio de metabolitos secundarios, lo que la distingue de la competencia que se refiere a la remoción o reducción de algún factor del medio (espacio, agua, nutrientes, alimento, luz) que es requerido por algún otro organismo conviviendo en el mismo hábitat ^(4 y 6). Sin embargo en muchos casos permanece poco claro hasta que punto la alelopatía juega un papel en la determinación de la superioridad de una planta en comunidades naturales o agrícolas porque otro mecanismo, como la competencia, podría operar simultáneamente. ^(6 y 35)

3.2.1 Alelopatía elemental

La interferencia alelopática ha sido generalmente discutida en torno a la producción de compuestos orgánicos tóxicos, pero no solo estos compuestos son usados por las plantas

para interferir con otra, se ha encontrado también que elementos inorgánicos podrían ser utilizados de manera alelopática. Por ejemplo el fitoenriquecimiento o exudado de raíces, una planta que puede incrementar la concentración de algún elemento como metales pesados y sales solubles en sistemas terrestres y elementos sulfurados en sistemas acuáticos, a niveles tales que interfieran con sus plantas vecinas y favorezca su éxito por encima de estas. Este tipo de interacción conocida como “alelopatía elemental” ha sido considerada un subconjunto de la alelopatía, aunque solo se han reportado pocos estudios²⁷.

El fitoenriquecimiento de estos elementos por plantas terrestres se da por hiperacumulación y deposición de desechos. Ocurre cuando una planta acumula un elemento en sus tejidos aéreos a concentraciones mayores que en el suelo y a las toleradas por otras plantas en sus hábitats naturales. Un segundo proceso de fitoenriquecimiento podría ser la alteración de nutrientes disponibles en la rizosfera a través de la producción de exudados de raíz, durante el cual algunas raíces son capaces de relacionar sustancias tales como quelatos y acidificantes dentro del suelo para aumentar la disponibilidad de varios nutrientes³³.

3.3 Demostración de alelopatía

La demostración de efectos alelopáticos requiere evidencia de varios tipos: a) demostrar los efectos adversos de la planta supuestamente alelopática sobre otras plantas; b) que la planta en cuestión tenga sustancias químicas capaces de interferir negativamente con el crecimiento y desarrollo de otras plantas; c) que estos aleloquímicos se liberen de forma natural o como consecuencia del manejo de la planta en el campo y d) que los aleloquímicos se liberen o se acumulen en el ambiente en concentraciones suficientes para causar efectos negativos en plantas con las que la planta fuente convive o puede convivir^(18 y 19).

3.4 Liberación de aleloquímicos a la atmósfera

La liberación de aleloquímicos al ambiente ocurre principalmente de acuerdo con Tukey (1969) por diferentes procesos que se muestran en la Fig.1 ^(4,6,18,21,42 y 44).

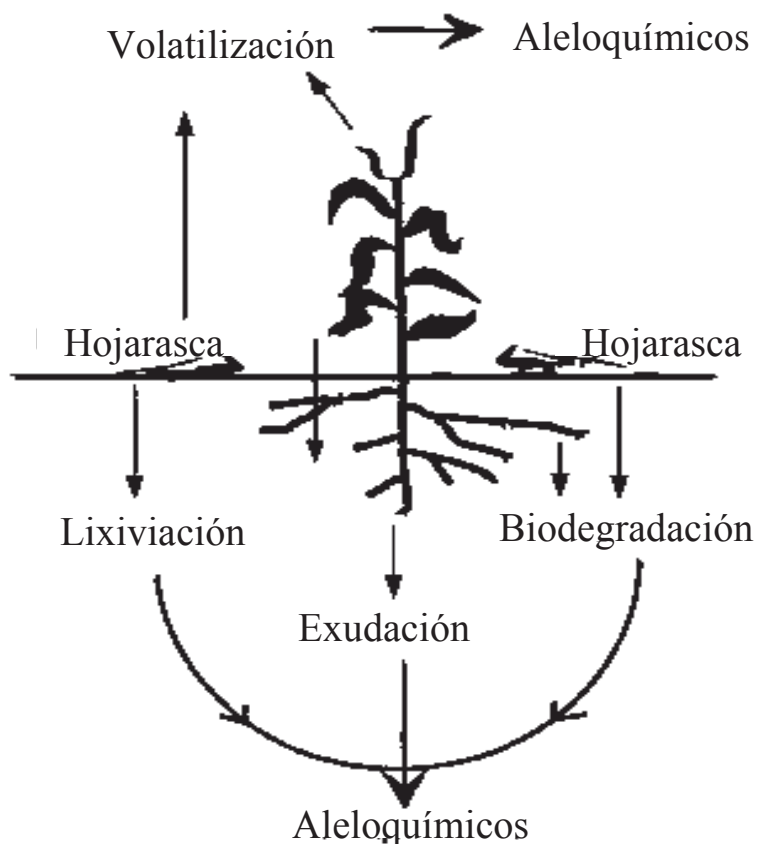


Figura 1. Formas de liberación de aleloquímicos al ambiente.

3.4.1 Volatilización

La volatilización ocurre principalmente en las hojas, flores y frutos. Los MS que se volatilizan, pueden ser directamente de la atmósfera por las plantas vecinas o retenidos por las partículas del suelo donde afectan a las raíces de las plantas, por contacto directo o a través de la solución del suelo. Aparentemente, algunos terpenos actúan de esta manera ^(6 y 34). Los aceites esenciales son ricos en terpenoides particularmente en monoterpenos; en estos casos puede haber una liberación continua de estos compuestos a la atmósfera.

Es muy diversa la literatura que describe los efectos citotóxicos de los aceites esenciales y monoterpenoides puros, (sus principales constituyentes) ^(14 y 35).

De este modo diversas especies pertenecientes a regiones climáticas distintas, pueden expresar la alelopatía por medio de la volatilización, pero esto no quiere decir que todas las plantas aromáticas son alelopáticas⁶.

3.4.2 Lixiviación

Se refiere a un lavado de las partes aéreas o raíces de las plantas, por medio de la lluvia, el rocío o la niebla. Este hecho forma parte del ciclaje de nutrimentos en los ecosistemas, una cantidad de este material lixiviado es reabsorbido nuevamente por las plantas ^(6 y 12).

Los compuestos químicos que pueden liberarse por medio de la lixiviación, pertenecen a diversos grupos químicos, por ejemplo, diversos aleloquímicos como alcaloides, ácidos orgánicos, fenoles, terpenos, etc., y otros compuestos no implicados en alelopatía como azúcares libres, aminoácidos y vitaminas. Los aleloquímicos mas comúnmente identificados han sido los fenoles ^(4,6 y 12).

3.4.3 Exudación

A través de las raíces, aunque son menos frecuentes y se almacenan generalmente en pequeñas cantidades, son significativos desde el contexto alelopático, puesto que muchos de ellos pueden influenciar a los microorganismos del suelo y las plantas aunque resulta complicado separar los exudados de los compuestos que resultan de la descomposición de las células muertas de las raíces⁶.

3.4.4 Descomposición de la materia orgánica

Este proceso realizado por microorganismos del suelo es esencial para el reciclaje de nutrientes en el ecosistema debido a que es el proceso que aporta la mayor parte de aleloquímicos a la rizosfera. Las variables mas importantes de este proceso son la naturaleza de los residuos vegetales, el tipo de suelo y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la descomposición ^(4 y 6).

El hecho de que haya una dinámica de este tipo no quiere decir que todas las sustancias serán destruidas, transformadas o neutralizadas; existe la posibilidad de que la toxicidad permanezca a medida que se formen nuevos productos tóxicos durante las continuas y diversas transformaciones de la materia orgánica, o de los exudados o lixiviados de raíces y partes aéreas de las plantas ^(6 y 29).

La acción química de estos compuestos aleloquímicos dependerá de la forma de liberación de la planta y del tejido de donde hayan sido desprendidos (Fig. 2) así como de su estructura molecular.

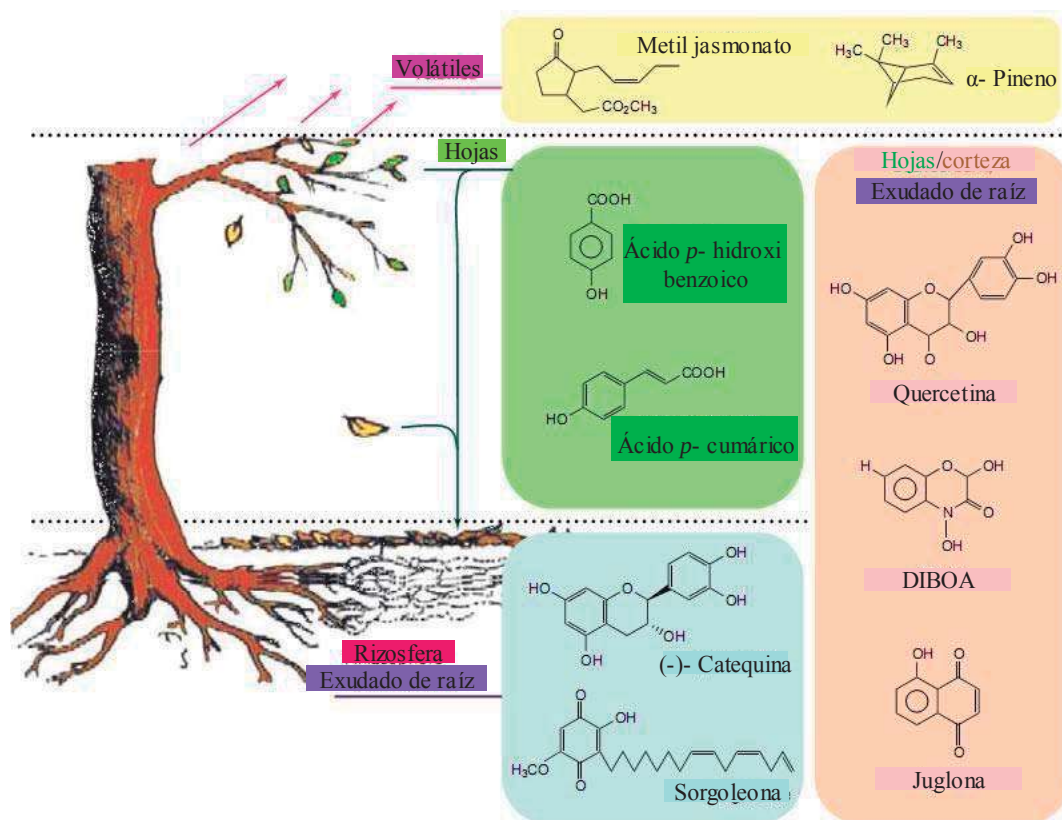


Figura 2. Ejemplos de compuestos alelopáticos, su forma de liberación y tejidos de donde han sido encontrados. Los mecanismos de acción de algunos de estos compuestos ha sido descrito. ³⁴

3.5 Mecanismos de acción de los alelopáticos

Los aleloquímicos de la planta donadora según Putnam y Tang, (1986), pueden interferir directamente con los procesos metabólicos de la planta receptora. La actividad biológica de estos compuestos, va a depender de su naturaleza química, de su concentración, de la

sensibilidad de la planta receptora, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales. Sin embargo, los efectos pueden manifestarse de manera indirecta, a través de un aumento en la susceptibilidad a ciertas enfermedades en la planta receptora, o bien de una inhibición de algunos microorganismos cuya relación con la planta sea vital; por ejemplo, las bacterias nitrificantes del suelo, las fijadoras de Nitrógeno (*Rhizobium*) y las micorrizas que desempeñan un papel fundamental en la nutrición de las plantas⁶.

3.5.1 Efectos indirectos

Las plantas con potencial alelopático indirecto contra otros organismos inducen cambios netos en el ecosistema que pueden impactar a las comunidades vegetales a largo plazo. Los metabolitos secundarios son depositados en el suelo a través de exudación o deposición del material vegetal, proporcionando una rica fuente de Carbono que es utilizada por las poblaciones microbianas del suelo. La composición de estos metabolitos influye en la diversidad de estos microbios en la rizosfera y afecta potencialmente las plantas con quienes ellos interactúan³⁴. Por ejemplo, en un estudio se observó que la adición de 1 % de solución de saponinas de *Gypsophila paniculata* fue suficiente para cambiar la dinámica poblacional de la rizosfera de trébol (*Trifolium subterraneum*). Después del tratamiento con saponinas, las dos especies de bacterias dominantes en esta rizosfera, *Chryseomonas* spp. y *Acinetobacter* spp, decrecieron significativamente, mientras que la bacteria dominante en la rizosfera de *G. paniculata* (*Aquaspirillum* spp) se transformó en la especie mayoritaria. En este estudio se observó que aunque la biomasa de *T. subterraneum* no fue afectada, la cantidad y la composición de especies bacterianas en la rizosfera determina la capacidad de las plantas de obtener nutrientes del suelo y con ello determina su abundancia con respecto a otras especies³⁴.

3.5.2 Efectos directos

Aunque se reconoce que muchos aleloquímicos tienen más efectos tóxicos sobre la germinación de las semillas que en el desarrollo y viabilidad de la planta adulta, se han reportado diferentes efectos de los metabolitos aleloquímicos en las plantas³⁴. Esta interferencia en los procesos metabólicos es diversa, lo cual implica una gran variedad de modos de acción de los alelopáticos. Cuando el efecto de un alelopático producido por una planta se manifiesta, por ejemplo, a través de la inhibición del crecimiento radicular, esto

significa que se está afectando de manera específica a diversos organelos celulares relacionados con el funcionamiento de mitocondrias (respiración), cloroplastos (fotosíntesis), meristemos primarios y secundarios (división y elongación celular), propiedades de las membranas, cinética enzimática, síntesis de proteínas, estructura cromosómica, reproducción expresión genética etc.^(6 y 34) A continuación se describen algunos de estos mecanismos.

3.5.2.1 Cloroplastos (fotosíntesis)

Un efecto directo de la alelopatía bien caracterizado es la inhibición de la fotosíntesis a través de interacciones con el fotosistema II, como el reportado para la sorgoleona, una benzoquinona lipofílica aislada de exudados radiculares de *Sorghum bicolor*. En un estudio en que se probaron el efecto de la sorgoleona en cloroplastos y membranas tilacoides se determinó que esta puede inhibir específicamente la cadena de transporte de electrones en manera similar a los herbicidas de triazina³⁴.

3.5.2.2 Mitocondria (Interrupción de respiración oscura y síntesis de ATP)

Se ha reportado que la (-)- catequina extraída de *Centaurea maculosa* puede inhibir la germinación de semillas de otras plantas e incluso de ella misma^(10 y 43), incluso que *C. maculosa* podría utilizar aleloquímicos para controlar su propia población para reducir la competencia por recursos limitados. Se ha sugerido que uno de los mecanismos de inhibición de la germinación puede ocurrir por rompimiento de la respiración “oscura” o mitocondrial.³⁴

La respiración oscura es a menudo considerada un proceso de tres fases iniciado con la glucólisis, en la cuál la glucosa es degradada hasta piruvato, compuesto que ingresa al ciclo de Krebs para generar CO₂ y NADH. Finalmente, la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones ocurre utilizando el NADH generado durante el ciclo de Krebs, produciendo una gran cantidad de ATP. Ahora bien, durante la germinación de las semillas, hay un rápido incremento en la actividad glucolítica vinculada al incremento del ritmo de la respiración, esta actividad es necesaria para movilizar los carbohidratos almacenados para proveer la semilla de poder reductor, ATP y productos carbonados necesarios para la biosíntesis de raíces y partes aéreas de las emergentes plántulas³⁴.

La germinación en *Pinus laricio* es inhibida por muchos compuestos fenólicos provenientes de los suelos donde crecen árboles de *P. laricio* y *Fagus sylvatica*. Esta inhibición ha sido atribuida a la interrupción de la actividad de algunas enzimas metabólicas que están involucradas en la glucólisis y la ruta de la pentosa fosfato, la cuál toma los sustratos de la glucólisis y canaliza nuevamente estos productos a la glucólisis. El mecanismo molecular exacto de esta interrupción, no ha sido determinado, pero se ha observado un decremento en las enzimas glucolíticas aldolasa (ALD) y glucosafosfato isomerasa (PGI) junto con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (C6PDH) que cataliza el primer paso de la ruta pentosa fosfato, en presencia de compuestos fenólicos tales como ácidos vainillínico, *p*-cumárico *p*-hidroxibenzoico y protocatecoico encontrados en el suelo las especies antes mencionadas, que fueron probados solos y en combinaciones y fueron capaces de inhibir la actividad enzimática de todas o de la mayoría de las enzimas monitoreadas³⁴.

3.5.2.3 Especies reactivas de Oxígeno intermediadas por mecanismos alelopáticos

Las transformaciones redox que tienen como productos especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un rol importante en interacciones entre plantas, sus patógenos, mutualistas y competidores.

La toxicidad de muchas quinonas y fenoles puede ser atribuida en gran medida a la formación de radicales semiquinona que donan electrones a oxígeno molecular formando iones superóxido (O_2^-). Estos pueden someterse a una serie de reacciones para transformarse en los más reactivos radicales hidroxilo ($OH^\cdot$) o hidropéroxilo ($HO_2^\cdot$). Subsecuentemente estos radicales pueden afectar la permeabilidad de la membrana, causando daño en ADN y proteínas y generar lípidos peroxidados. Algunos aleloquímicos rápidamente despolarizan la membrana celular, incrementando la permeabilidad de la célula, induciendo la peroxidación de los lípidos causando una desorganización celular generalizada que finalmente mata a la célula^(41, 42 y 43).

3.6 Mecanismos de resistencia a aleloquímicos

Se ha reportado que algunas plantas reducen los efectos de los aleloquímicos producidos por las plantas vecinas. Estos mecanismos de desintoxicación incluyen la conjugación, secuestro, o secreción de carbohidratos y la oxidación de los compuestos fitotóxicos. Las plantas que metabolizan productos de degradación de benzoxazilona, benzoxazolin-1(3H)-ona (BOA), destoxifican estos aleloquímicos a través de N-glucosilación mediante la adición de una pentosa o por oxidación seguida de glucosilación. Los productos resultantes de esta actividad son similares estructuralmente pero menos tóxicas como el caso de BOA-6-O-glucósido^(40,41 y 42).

Se ha reportado que la pulegona y el citral han mostrado ser inhibidores activos en fase líquida en concentraciones del orden de 0.1 mM.¹⁷ Por ejemplo, la germinación de las semillas de trigo fue muy afectada cuando estos aceites fueron aplicados en fase gaseosa a concentraciones de 25-80 nl ml⁻¹ estos inhibieron la germinación en un 50 %. Los mayores componentes de los aceites esenciales de las siguientes tres especies representan diferentes monoterpenos, citral 80 % (aldehídico) en, pulegona 70 % (cetónico) y carvacrol (fenólico).¹⁷ Debido a que estos componentes se encuentran disponibles en forma pura, fueron probados en la germinación de semillas de trigo, donde se encontró que estos compuestos fueron metabolizados. Citral compuesto por geranial y neral fueron transformados a su correspondiente alcohol: geraniol y nerol, y en menor proporción en ácido geránico y nérico, el monoterpeno cetónico pulegona fue metabolizado a productos mucho menos tóxicos: mentofurano y isomentona. El compuesto fenólico carvacrol fue transformado a un compuesto no identificado¹⁷, y los efectos de estos productos fueron significativamente menos inhibitorios que los originales. Así mismo se reporta que otros compuestos aldehídicos tales como citronelal, vainillina, y decanal fueron también metabolizados, resultando en productos menos tóxicos¹⁷.

Los procesos de destoxificación mediante el cual los monoterpenos tóxicos son transformados en especies menos tóxicas, no son bien conocidos aún. En el caso de los monoterpenos aldehídicos, que provienen de la reacción entre un alcohol y un ácido, podrían deberse a la acción de una enzima no específica alcohol deshidrogenasa que actúe como agente desintoxicante¹⁷.

3.7 Evidencias de Alelopatía

Uno de los casos mejores conocidos y estudiados ejemplos de alelopatía es el de “fenómeno *Salvia*”, el cual se refiere a *Salvia leucophylla* un arbusto observado en la costa sur de California. En esta región *S. leucophylla* forma se distribuye en forma de chaparrales adyacentes a áreas de pastizales anuales con un característico patrón: pastizales anuales y forrajes excluidos del interior del matorral de arbustos y matorrales rodeados por áreas de suelo desnudo sin pastizales con una extensión promedio de 1-2 m. Del tercer al sexto metro más allá de los densos arbustos, las hierbas se observan atrofiadas y la vegetación gradualmente se fusiona con los pastizales normales a unos 6-10 m mas allá de los arbustos²⁹.

Otras especies muy estudiadas y conocidas por su potencial alelopático son las del género *Eucalyptus*, las cuales han sido asociadas con la producción de zonas de inhibición alrededor o bajo los árboles donde la vegetación es poco diversa, vigorosa y/o densa.^(18 y 19)

En un estudio se compararon la productividad y la diversidad del sotobosque de plantaciones de especies introducidas en la India (*Leucaena leucocephala*, *Casuarina equisetifolia* y *Eucalyptus tereticornis*). Encontraron que el sotobosque de *L. leucocephala* tuvo menos especies que el de eucalipto y éste, a su vez, menos que el de *C. equisetifolia*. Sin embargo, la biomasa de la flora del sotobosque del eucalipto fue menor que el de otras dos floras. Los autores atribuyeron estos efectos a aleloquímicos, pues no se encontraron diferencias en nutrientes y humedad en los suelos de las plantaciones y de sitios abiertos. Al igual que la cantidad de luz que alcanzaba el sotobosque era igual entre las plantaciones^(18 y 19).

Otra especie reportada como alelopática es *Scytonema hoffmanni*, la cual produce un compuesto lipofílico de bajo peso molecular denominado cianobacterina, el cual inhibe el flujo de electrones fotosintético en otras algas y en cloroplastos aislados de angiospermas. También se ha aislado derivados del indol de *Hapalosiphon fontinalis*, los cuales han mostrado tener propiedades alguicidas. Otras especies como *Fischerella muscicola* y *F. ambigua* también están reportadas como productoras de alelopáticos activos contra otras cianobacterias, clorofilas y diatomeas⁶.

Otros ejemplos que han sido investigados se muestran en el Cuadro 1

Cuadro 1. Ejemplos de alelopatía de investigaciones publicadas²¹.

Planta alelopática	Impacto
Filas de nogal negro interplantado en cultivos de maíz	Reducen el rendimiento de maíz por la producción de juglona, componente alelopático del nogal negro
Brotes y raíces de lantana, arbusto perenne leñoso nocivo en cítricos de Florida, incorporados en el suelo	Reducen germinación y desarrollo de enredaderas de algodóncillo (<i>Asclepias syriaca</i>) y otra hierba
Extractos de hojas y compuestos volátiles de naranja agria, cítrico ampliamente anteriormente usado como portainjerto	Inhiben la germinación de semillas y el crecimiento radicular de amaranto, pasto bermuda y quinuilla
Arce rojo, roble castaño pantanoso, cedro rojo y laurel dulce	Sus extractos de madera, inhiben la germinación de las semillas de lechuga tanto o más que los extractos de nogal negro
Árboles de eucaliptos y neem	Una relacion alelopatica espacial si trigo estuviera creciendo dentro de 5 m
Lixiviados de árbol casto	Retrasan el crecimiento del zacate pangola, pero estimulan el crecimiento de bluestem, otra especie de pastizal
Polvo desecado de hojas de mango	Inhibe completamente el brote de chufa púrpura
Alantona asilada del Árbol del cielo	Actividad herbicida no selectiva post-aparición actividad similar a glifosato y paraquat, herbicidas comerciales
Residuos de brócoli	Interfieren con el crecimiento de otros cultivos de crucíferas

3.8 Sucesión secundaria

La mayoría de los tipos de vegetación están sujetos a cambios temporales tanto en composición de las especies como en la importancia relativa de las formas de vida que las constituyen. Esos cambios pueden clasificarse en dos clases: estacionales y cíclicos. Durante

los cambios sucesionales hay una alteración progresiva en la estructura y composición de las especies de la vegetación, mientras que durante los cambios cíclicos los tipos similares de vegetación se repiten en el mismo lugar a diversos intervalos de tiempo. En el caso de la sucesión, se puede observar una diferencia entre los cambios que ocurren durante la colonización de un hábitat nuevo, que inicialmente carece de sustrato y vegetación (sucesión primaria); y los que caracterizan las circunstancias, en los que la sucesión es una etapa de progreso de colonización de un hábitat perturbado (sucesión secundaria)²⁴.

3.8.1 Sucesión secundaria en ambientes productivos

En localidades donde los suelos y el clima favorecen una alta productividad, hay una fuerte tendencia que la vegetación no perturbada este dominada por los árboles. Así mismo los claros en el bosque están sujetos, en ausencia de una alteración adicional, a un proceso característico de recolonización en que las plantas anuales, herbáceas perennes, arbustos y árboles van apareciendo sucesivamente en la vegetación. La dominancia competitiva desempeña una función importante en el proceso mediante el cual las plantas anuales son desplazadas por las herbáceas perennes. Sin embargo, los efectos de dominancia durante las etapas sucesionales posteriores son más variados y complejos. Ya se ha hecho referencia a las tasas de crecimiento relativamente lentas de arbustos y árboles, la inevitable consecuencia del gasto de reservas en la formación de las estructuras de sostén (troncos, ramas, etc.) a expensas de la superficie foliar. Sin embargo, se puede considerar la posibilidad de que el proceso de sucesión se atenúe aún más por los efectos de las herbáceas perennes sobre las plántulas y los árboles jóvenes de las especies leñosas. El establecimiento de plántulas y árboles puede ser fuertemente inhibido por la presencia de herbáceas competitivas, que debido a su capacidad de expansión lateral por encima y por debajo del terreno, están mejor adaptadas para dominar la vegetación a corto plazo. Como extensión a esta hipótesis, se puede suponer que la tendencia de los arbustos a dominar la etapa intermedia de la vegetación en hábitats productivos se relaciona con el tipo de ramificación del vástago que en contraste con la mayoría de los árboles, permite, en una etapa temprana del crecimiento, la expansión lateral del follaje y la competencia efectiva con las herbáceas por la luz. ^(17 y 24)

Las especies leñosas que hacen su aparición temprana en el curso de la sucesión de la vegetación en hábitats productivos se asemeja en varios aspectos a las herbáceas competidoras a las cuales han sucedido. En comparación con otros árboles, sus

características incluyen rápidas tasas de producción de materia seca, continuo alargamiento del tallo, producción de hojas durante la estación de crecimiento, y rápidos ajustes fenotípicos en la superficie foliar y morfología del vástago como reacción a la sombra. Una característica adicional de los árboles y arbustos competitivos es su baja tolerancia a la sombra intensa según se cierra el follaje de los árboles jóvenes más pequeños se decoloran seriamente y mueren²⁴.

Cuando los árboles competitivos más altos alcanzan la madurez, la mayoría de los arbustos sucumben al efecto de la sombra o llegan al final de su término de vida y envejecen. Entonces alcanza prominencia un nuevo elemento constituido por árboles con diversos grados de tolerancia a la sombra. Las plántulas de muchos árboles tolerantes a la sombra pueden haber estado presentes en cantidades relativamente pequeñas desde una etapa temprana de la sucesión, pero debido a sus lentas tasas de crecimiento fueron sobrepasados por los árboles y arbustos competidores y son poco notables²⁴.

3.8.2 En ambientes improductivos

Cuando la productividad del hábitat es baja, la función de las plantas ruderales y los competidores en la sucesión secundaria se reduce mucho, y las herbáceas, arbustos y árboles tolerantes a las restricciones se vuelven relativamente importantes en una etapa temprana. La forma de crecimiento y la identidad de las especies clímax varía de acuerdo con la naturaleza e intensidad de las restricciones del hábitat. En lugares en que el grado de restricción es moderado, como en las regiones semiáridas o en suelos muy someros y deficientes de nutrientes, la vegetación clímax se compone a menudo de arbustos escléofilos y árboles pequeños de crecimiento relativamente lento²⁴.

Bajo limitaciones más severas, como las que existen en hábitats árticos y alpinos, puede ocurrir que las especies ruderales y las competitivas sean totalmente excluidas y en este caso, tanto las sucesiones primarias como las secundarias quedan limitadas simplemente a la colonización por líquenes, algunas briofitas, pequeñas herbáceas y arbustos enanos.²⁴

3.9 Composición química del género *Eupatorium*

El género *Eupatorium* pertenece a la tribu *Eupatorieae* y subtribu *Eupatoiinae* una de las trece tribus de la familia *Asteraceae*, un grupo complejo taxonómicamente que comprende cerca de 1200 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales de América, Asia, África y Europa. Han sido reportados muchos estudios sobre especies³⁶ del género *Eupatorium*, en los que se reporta un gran número y diversidad de productos naturales bioactivos, principalmente lactonas sesquiterpénicas, de tipo guanolidos, germacrenolidos, heliangolidos y eudesmanolidos; como compuestos característicos. Se han detectado alrededor de 149 compuestos en el género *Eupatorium*, tales como derivados de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, alcaloides de pirrolicidina, aceites esenciales y derivados del timol^(1,2,27,46 y 47) siendo los derivados sesquiterpénicos los compuestos mas predominantes.

Este género es caracterizado por ser aromático, razón por la cual sus aceites esenciales contienen la mayor cantidad de compuestos químicos. Incluso se reporta que algunas especies de este género se caracterizan por tener un olor agradable cuando el tallo es cortado.^(46 y 47)

Se han aislado 31 monoterpenos, gran parte de ellos derivados del timol los cuales pueden ser clasificados dentro de tres grupos en función de sus niveles de oxidación: i) un O- funcional en C (9), ii) dos O-funcionales en C(8) y C(9) y iii) tres O- funcionales en C(8),C(9) y C(10).

Por otra parte se han aislado un total de 26 sesquiterpenos cíclicos denominados por su esqueleto tri o biciclico *guaianes*, provenientes de especies como *E. chinense*, *E. lindleyanum*, *E. kiirunense*, *E. japonicum*, *E. glehni*. Además se han caracterizado 12 compuestos por un anillo de 10 carbonos nombrados *germacrenos* aislados de *E. kiirunense* y *E. glehni*. También se reportan cadinenos y una lactona sesquiterpénica aislados de flores de *E. adenophorum*. Y para las especies *E. bunifolium* y *E. glutinosum* se han reportan 15 diterpenos y 3 triterpenos para la segunda.

Respecto a los flavonoides, alrededor de 29 flavonoides han sido caracterizados en este género específicamente flavones y sus respectivos glucósidos excepto por una chalcona y 2 flavanones.

También son comunes en este género: alcaloides de pirrolicidina, los cuales has sido aislados en *E. fortunei*, en *E. semialatum* y *E. clematideum*. También han sido reportados

otros compuestos menos diversos en el género *Eupatorium*, como esteroides y ácidos orgánicos^(1,2,25,27,29,46 y47)

3.9.1 Usos medicinales del genero *Eupatorium*

Plantas del género *Eupatorium* han sido usadas durante muchas décadas en medicina tradicional como agentes antimalaria, antifúngicos, anti-inflamatorios, astringentes, desinfectantes, antiherpéticos, antirreumáticos y analgésicos^(2 y 46). En otros estudios también se ha reconocido su actividad larvicida específicamente de *E. betonicaeforme* contra larvas del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla y del dengue hemorrágico².

Así mismo se han reportado lactonas sesquiterpénicas y otros diterpenos cíclicos aislados del género *Eupatorium*, como agentes citotóxicos contra ciertas líneas celulares tumorales (HL-60, SMMC-7721, BEL-7402, P-388 y A-549) y células cancerígenas como KB, HeLa y hepa59T/VGH. También se han reportado como agentes antibacterianos a diterpenos encontrados en este género, ya que han mostrado actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Incluso se ha reportado el efecto de los extractos acuosos de las partes aéreas de *E. buniifolium* como anticonceptivos⁴⁶.

Un gran número de productos naturales bioactivos, han sido reportados en los extractos de las especies de *Eupatorium*, especies que podrían ser biorrecursos prometedores para el desarrollo de drogas potenciales y productos con valor agregado. Este género también ha jugado roles ecológicos importantes en los hábitats en que se encuentran como es el caso de *E. adenophorum* Spreng, especie nativa de México también conocida en China como “diablo mexicano” por ser una especie invasiva exitosa en el sur de aquel país. Interfiere en el crecimiento y establecimiento de especies nativas vía alelopatía principalmente a través de sus extractos acuosos⁴⁷.

3.9.2 *Eupatorium glabratum* Kunth

Taxonomía:

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Eupatoriae

Género: *Eupatorium*

Especie: *glabratum*

Pertenece a la familia de las Asteraceae, arbusto hasta de 2.5 m de altura; tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 3 mm de diámetro hacia la parte superior, estriados, amarillentos, glabros a veces algo resinosos–lustrosos; hojas opuestas, peciolo de 0.5 a 2 cm de largo, glabro, lamina oblanceolada de 1.5 a 8 cm de largo por 0.5 a 4 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde aserrado o subentero, base cuneada, haz glabro, envés glabro y glanduloso–punteado, frecuentemente resinoso–lustroso, a veces algo blanquecino, uninerve desde la base, membranacea o algo subcoriacea; numerosos capítulos de 7 a 15 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos glabros, resinoso-lustrosos; involucre campanulado, de 5 mm de largo por 4 mm de ancho, cubriendo menos de la mitad de largo de las corolas, sus brácteas dispuestas en 3 series algo desiguales, y de largo, blanca, a veces con tinte rosado en los lóbulos, glabra; aquenio de mas menos 3 mm de largo, algo piloso especialmente hacia el ápice, vilano casi del largo de la corola, cerdas blancas. Originaria de México, habita en clima templado entre los 1900 a los 2750 msnm y crece a orillas de caminos asociada a vegetación perturbada de pastizal, bosques de encino, pino y junípero⁹ (Fig. 3).



Figura 3. *Eupatorium glabratum* ubicada en el llano de pario.

3.10 Métodos de extracción y análisis

Se utiliza para separar los componentes de mezclas. Primero la evaporación de la sustancia que tiene menor punto de ebullición, y, después la condensación de este vapor en un recipiente separado.⁸ Los tipos más comunes de destilación son: *Destilación simple, fraccionada, al vacío, azeotrópica, por arrastre de vapor*. En este último tipo de destilación, se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros no volátiles. Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el interior de la mezcla, denominándose este "vapor de arrastre", pero en realidad su función no es la de arrastrar el componente volátil, sino condensarse en el matraz formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso se tendrán la presencia de dos fases insolubles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la de un líquido puro a una temperatura de referencia^(8, 11)

La condición más importante para que la destilación por arrastre de vapor pueda ser aplicada, es que tanto el componente volátil como la impureza sean insolubles en agua ya que el producto destilado (volátil) formará dos capas al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto y del agua fácilmente. La presión total del sistema será la suma de las presiones de vapor de los componentes de la mezcla orgánica y del agua, sin embargo, si la mezcla a destilar es un hidrocarburo con algún aceite, la presión de vapor del aceite al ser muy pequeña se considera despreciable para efecto de los cálculos.^(8 y 11)

3.10.1 Cromatografía

Es un conjunto de técnicas de separación de los componentes de una mezcla en una disolución para la caracterización de mezclas complejas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes de una mezcla a través de una sustancia o fase estacionaria que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase

estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. El proceso de separación de los componentes de una muestra tiene lugar por elución, proceso inverso a la adsorción, siendo el eluyente la fase móvil.^(8,20)

La técnica cromatográfica usada fue en esta investigación fue la cromatografía de gases, la cual es una técnica muy empleada para propósitos analíticos ya que permite la separación rápida y fácil de la mezcla, incluso la determinación e identificación de sus componentes. Esta técnica requiere que el analito de interés sea estable a cambios de temperatura y se pueda volatilizar^(8 y 20).

En esta técnica la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna comúnmente capilar, columna a través de la cual la muestra eluye por medio del flujo de un gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, pues su única función es la de transportar el analito a través de la columna^(8,20).

3.10.2 Espectro de masas

Una vez que las moléculas recorren toda la columna dentro de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, son bombardeadas por un haz de electrones para obtener su espectro de masas. Las moléculas son ionizadas bajo ese haz de electrones, rompiéndose en varios fragmentos de iones positivos, negativos y neutros. Cada tipo de ion tiene una relación particular de masa carga (m/z) cuya abundancia relativa permite identificar la molécula de origen.^(28 y 34) El pico mayor se denomina pico base cuya abundancia se toma como 100 y las de los otros picos se expresan en relación con el pico base. El diagrama que ilustra las proporciones relativas de las señales correspondientes a los diversos valores m/z se denomina espectro de masas, el cual es característico para compuesto en particular^(24, 28), por lo que es usado para comprobar la identidad de los compuestos^(28 y 34). El espectro de masas también ayuda a establecer la estructura de una sustancia nueva por medio de diferentes maneras: conocer un peso molecular exacto, una fórmula o indicar la presencia de ciertas unidades estructurales en una molécula.

Al eliminar un electrón de la molécula original, se genera un ion molecular (o ion matriz), cuyo valor m/z es evidentemente el peso molecular del compuesto. A veces, el pico M^+ es el base y puede reconocerse fácilmente. Sin embargo, a menudo no lo es y se requiere un

trabajo considerable para localizarlo. Una vez identificado este ion matriz, proporciona el peso molecular más exacto que puede medirse.

IV. HIPOTESIS

Si la presencia de *E. glabratum* en Llano de Pario, imposibilita el establecimiento de *Lupinus elegans*, y por consiguiente de algunas especies del género *Pinus*, por medio de aleloquímicos volátiles, entonces:

1. Las hojas de *Eupatorium glabratum* poseerán componentes volátiles con potencial alelopático.
2. Los componentes del aceite esencial de *E. glabratum* inhibirán in vitro la germinación de semillas y crecimiento temprano de plántulas de *Lupinus elegans*, *Pinus oocarpa* y *Lactuca sativa*.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Comprobar si el aceite esencial de *Eupatorium glabratum* contiene componentes con potencial alelopático capaz de inhibir o interrumpir el crecimiento tardío y germinación de semillas de *Pinus oocarpa*, *Lupinus elegans* y *Lactuca sativa* var. *longifolia*

Objetivos específicos:

Aislar el aceite esencial de las hojas de *E. glabratum*, tanto de su parte hidrofílica como la hidrofóbica, y caracterizar cada fracción mediante cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas.

Exponer semillas y plántulas de *Pinus oocarpa*, *Lupinus elegans* y *Lactuca sativa* var. *longifolia*, a los compuestos volátiles del aceite esencial (hidrofóbicos e hidrofílicos) de *Eupatorium glabratum*, en diferentes concentraciones para determinar su efecto alelopático.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

a) Planta

Se realizaron tres colectas de *Eupatorium glabratum* de hojas y raíz en el paraje denominado “Llano de Pario” ubicado en el municipio de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, 8 km al norte de la cabecera municipal. Esta zona está cubierta por lava volcánica de la erupción del volcán Parícutín, por lo que presenta diferentes condiciones para la sucesión primaria y secundaria en zonas como la “mesa de Cutzato”. Área equiparable con Llano de Pario, la cual ha sido estudiada para determinar la composición y estructura vegetal, después de 50 años de la erupción del Parícutín. En la mesa de Cutzato se reportan cuatro especies como especies dominantes, las cuales están distribuidas en forma de manchones: *Eupatorium glabratum* (23 %) seguida de, *Senecio stoechadiformis* (14%), *Senecio salignus* (12%) y *Muhlenbergia minutissima* (6%). Especies que también han sido reportadas de sucesión temprana o tolerantes a perturbaciones^(3,23,30 y 31).

En cada visita se colectó aproximadamente 12 plantas de *Eupatorium glabratum* en distintas épocas; las primeras dos se realizaron en octubre y noviembre del 2007 en las que se colectaron 4 Kg de hoja y 4Kg de raíz. En la tercera y última, en julio del 2008, se colectaron 8 Kg de hoja. Se colectaron las hojas de *E. glabratum*, porque se sospechaba que los compuestos alelopáticos se encontraban en las partes aéreas de la planta ya que el aroma de estos arbustos era un poco fuerte y desagradable. Se colectó raíz elegida porque se sospechaba que ésta podría emitir volátiles.

b) Semillas

Se utilizaron semillas de tres especies distintas como receptores, estas fueron: *Pinus oocarpa*, *Lupinus elegans* y *Lactuca sativa* L. var. *longifolia*.

Estas especies de semillas fueron elegidas porque *L. elegans* se encuentran en “Llano de Pario” en coexistencia con *E. glabratum*. *P. oocarpa* se utilizó solo para probar alguna especie del género *Pinus* y finalmente se empleó como testigo a *Lactuca sativa*, porque se ha reportado como especie susceptible a compuestos alelopáticos por diversos investigadores en la mayor parte de experimentos sobre alelopatía como: Anaya A .L (2003); Vokou D y col (2003); Yokotani T. K. y col (2003).

6.2 Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial de hojas y raíz de *E. glabratum* se realizó con una destilación por arrastre de vapor de agua en una autoclave marca Paragon. Las hojas de la planta sin tallo se depositaron en el interior de la autoclave y se expusieron a los vapores de agua. A una de las válvulas de escape, se le adaptó un tubo de acero inoxidable en forma de bastón que estaba conectado a su vez a dos refrigerantes (en cuyo interior fluía anticongelante automotriz o agua) y estos a un embudo de separación con 15 ml de hexano para recoger el agua condensación de la destilación (Fig. 4).

Los compuestos no polares o hidrofóbicos de la planta quedaron atrapados en el hexano, mientras que los compuestos hidrofílicos quedaron diluidos en el agua de condensación.



Figura 4. Equipo de destilación por arrastre de vapor

6.3 Extracción de los componentes del agua de arrastre de vapor

En cada destilación por arrastre de vapor de hoja o de raíz, se obtuvieron cuatro litros de agua, cuyos componentes lipofílicos fueron extraídos con acetato de etilo (AcOEt), agregando dos terceras partes de AcOEt, por cada volumen de agua proveniente del arrastre de vapor (A.Arr). Es decir que 200 ml de A.Arr fueron extraídos con 385 ml de AcOEt, para extraer obtener paulatinamente tres litros de agua de cada muestra. Otra parte del A.Arr fue reservada para realizar bioensayos de germinación y crecimiento temprano de semillas y plántulas.

6.4 Análisis químico

Los aceites esenciales de las hojas y los compuestos hidrofílicos de *E. glabratum* fueron analizados en un cromatógrafo de gases (HP Agilent 6890) acoplado a un detector selectivo de masas (HP MS 5973N). La inyección de la muestra fue de 0.5 μ l, inyección con división (split) a una temperatura de inyector 220 °C, usando helio como gas acarreador a una presión

de 8.84 psi y con un flujo constante de 64.4 mL/min. La temperatura programa del horno inició a 60 °C por 5 minutos, temperatura que aumentó 5 °C/min hasta llegar a 200 °C para finalmente aumentar 25 °C/min hasta llegar a 300 °C. Las condiciones usadas en el detector selectivo de masas fueron: velocidad de flujo de 1 ml/min, un voltaje de ionización a 69.9eV, con una temperatura de la interfase de 280°C, modo SCAN, y un rango de masas de 50-500 *m/z*. La señal de detector fue procesada con el programa Enviromental ChemStation (Agilent Technologies), ⁷ el cual que permite la identificación automática de los espectros de masas generados por comparación automática con los de la Biblioteca National Institute of Standars and Technology (NIST 05).

6.5 Bioensayos

6.5.1 Aceite Esencial/ Fracción hidrofóbica

6.5.1.1 Germinación y desarrollo de semillas expuestas a fracción hidrofóbica del aceite esencial

Para demostrar el potencial alelopático de los volátiles de *E. glabratum* se realizaron experimentos de germinación con semillas de las tres especies. Estas semillas se expusieron, en frascos de 250 ml de capacidad, a cuatro concentraciones de aceite esencial de *E. glabratum*: 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$ y 0.001 $\mu\text{L mL}^{-1}$ mas un tratamiento control.

Las semillas se pusieron a germinar en agar, el cual fue esparcido dentro y a lo largo de cada frasco. Las tapas de los frascos tenían pegado un trozo de algodón, algodón sobre el cual se inyectaron las diferentes dosis antes mencionadas del aceite esencial. Se dejo germinar dentro de una incubadora a temperatura constante (25 +/- 2°C) y se midió la longitud de radícula e hipocótilo durante siete días en el caso de *L. sativa*, y diez en el caso de *L. elegans* y *P. oocarpa*. Para cada tratamiento se realizaron tres replicas, con ocho semillas en cada frasco, y el experimento se repitió en tres ocasiones.

6.5.1.2 Desarrollo y crecimiento temprano de radícula e hipocótilo expuestos a fracción hidrofóbica del aceite esencial

Las condiciones y las dosis de este experimento son idénticas al experimento anterior sólo que en este caso las especies cultivadas fueron germinadas previamente de la siguiente forma:

a) *Lupinus elegans*: se escarificaron las semillas durante 30' en H₂SO₄ concentrado, se retiró el ácido y se enjuagaron las semillas con agua fría ^(3,19), para evitar contaminación microbiológica, se sumergieron algunos segundos en una solución de Captan 2 gr/Lt, se volvieron a enjuagar con agua destilada y se dejaron secar. Una vez secas las semillas se sembraron en cajas de petri con papel filtro en el fondo con 2 ml de agua. Este método de escarificación acida de las semillas permite obtener una tasa de germinación superior (89%) al obtenido con los métodos convencionales. ^(3,19)

b) *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* germinó de manera simple, solamente se colocaron las semillas en hojas de papel filtro en la superficie de cajas de petri, se le adicionaron 2 ml de agua destilada y se incubaron por 24 horas con lo que se obtuvo una germinación del 100% con tamaños homogéneos de radícula.

c) *Pinus oocarpa* se sometió a germinación con la misma técnica utilizada con *L. sativa*, aunque a diferencia de esta, *P. oocarpa* germinó entre 4 y 6 días después y el tamaño de los individuos fue muy heterogéneo en radícula e hipocótilo, tuvo una tasa de germinación de 80%.

Una vez que germinaron las semillas germinadas necesarias, se tomó medida de radícula e hipocótilo y se resembraron en las cámaras. Las plántulas fueron observadas y medidas diariamente durante siete días, con el fin de determinar la influencia de los aceites esenciales de *E. glabratum* sobre el desarrollo temprano de radícula e hipocótilo de las tres especies.

6.5.2 Agua de arrastre (A.Arr)/ Fracción hidrofílica

6.5.2.1 Germinación y desarrollo de semillas expuestas a fracción hidrofílica del aceite esencial

El A.Arr fue esterilizada filtrándola con una membrana Millipore de 0.45 µ y midiendo su potencial osmótico. Posteriormente fue utilizada para preparar los medios de cultivo en cuatro concentraciones distintas. La primera concentración se preparó con 25 mL de agua

destilada, y 75 mL de A.Arr (3:1). La segunda concentración se preparó con 33.3 mL de agua destilada y 66.6 mL de A.Arr (2:1). La tercera se hizo con 50 mL de agua destilada y 50 mL de A.Arr (1:1) y para la cuarta solamente se diluyó el agar en 100 mL de agua destilada (0:1). Para cada una de las concentraciones se disolvieron 1.7 g de agar. Una vez listos estos medios de cultivo se vertieron en cajas de petrí de 60 x 15 mm para cada concentración. El diseño del experimento fue factorial con dos factores: concentración de agua de arrastre (4 concentraciones) y especie blanco (3 especies); con 5 réplicas por tratamiento. De esta forma se sembraron 8 semillas por especie en cada caja. Estos experimentos se mantuvieron en incubación a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 6 a 11 días dependiendo de la especie de semilla, tiempo en el cual se determinó la tasa de germinación de las semillas por especie y se midió la longitud de radícula e hipocótilo bajo las diferentes concentraciones. Este experimento se repitió tres veces en las mismas condiciones.

6.5.2.2 Desarrollo y crecimiento temprano de radícula e hipocótilo expuestos a fracción hidrofílica del aceite esencial

Antes de hacer los bioensayos de alelopatía con las semillas, estas se pusieron a germinar usando los métodos anteriormente descritos, y una vez que el tamaño de la radícula alcanzó un tamaño mínimo de 2 mm, se germinaron en los respectivos medios de cultivo.

En el caso de *L sativa*, el diseño del experimento fue igual al anterior 4 concentraciones con ocho semillas por caja sin ninguna variación en las dosis. Para *P. oocarpa* si se modificó el diseño, se prepararon medios de cultivo con 3 concentraciones (3:1, 1:1 y 0:1) y 4 semillas por caja, las observaciones y mediciones se efectuaron diariamente durante 7 días, los experimentos se repitieron 3 veces. La especie *L. elegans* no fue incluida en este experimento.

6.5.2.3 Análisis estadístico.

Los valores de longitud (mm) obtenidos de las pruebas de germinación y crecimiento temprano de las semillas y plántulas de *Lactuca sativa*, *Lupinus elegans* y *Pinus oocarpa* fueron analizados con un Análisis de Varianza de Kruskal – Wallis y con un Análisis de Varianza de dos vías.

Los datos obtenidos de concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$) fueron transformados a valores de $\ln$ y $\log 10$ para mantener la homocedasticidad y la varianza no sea muy grande y se salga de los requisitos de normalidad.

Análisis de Varianza Kruskal-Wallis

Se utilizó para determinar la diferencia en la longitud de radícula e hipocótilo entre tratamientos, en las cuales, resultan estadísticamente significativas aquellas donde $p < 0.05$. Esta prueba no paramétrica examina la hipótesis nula que supone que las k muestras proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con respecto a los promedios. La prueba supone que la variable en estudio tiene como base una distribución continua⁷

Análisis de varianza (ANOVA)

La técnica del análisis de varianza consiste en separar de la variación total observada las causas o factores parciales, siguiendo los siguientes pasos:

- a) Clasificar o separar las causas parciales de variación.
- b) Calcular los grados de libertad (GL) para cada factor o causa parcial de variación.
- c) Calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones (SC) con respecto a la media, para cada una de las causas de variación.
- d) Calcular la varianza o cuadrado medio (CM) para cada factor de variación.
- e) Probar hipótesis por medio de la prueba de Fischer, conocida como prueba de F o relación de varianzas.
- f) Comparar los promedios (discriminar variables) por varios métodos.

Con las pruebas del análisis de varianza se hacen las pruebas de significancia de las diferencias, o las comparaciones entre las medias de las muestras. Para ello existen varios métodos como: prueba de Tukey, prueba de Duncan, prueba de t de Student y comparaciones ortogonales.

Todos los datos procesados de las mediciones obtenidas de los bioensayos, se realizaron en el programa Statistica versión 6.

VII RESULTADOS

7.1 Análisis químico del aceite esencial de hojas de *Eupatorium glabratum* Kunth

7.1.1 Análisis químico de fracción hidrofóbica

El rendimiento del aceite esencial de las hojas de *E. glabratum* fue del 0.35 % sobre peso seco.

Todos los aceites esenciales de las diferentes colectas de *E. glabratum* se analizaron por cromatografía de gases, análisis que permitió identificar 11 componentes puros (Cuadro 2) de los cuales: 8 son monoterpenos y tres sesquiterpenos. El 1-R- α -pineno con tiempo de retención de 5.96, fue el compuesto que se encontró en mayor proporción (28.23 %) seguido del α -felandreno (6.81%) (Fig. 5). Muchos de los picos con elevada abundancia no fueron identificados por encontrarse en mezcla o no ser reconocidos en la biblioteca de espectros de masas. El criterio usado para la identificación de los compuestos de la muestra fue el porcentaje de concordancia, el cual se obtiene al comparar el espectro de la muestra con los espectros de la biblioteca (NIST05). Si el valor es superior de 90% la probabilidad de que el compuesto haya sido identificado es mayor, y entre mas elevado sea mas confiable será la identificación⁷.

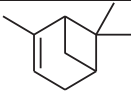
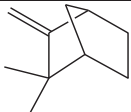
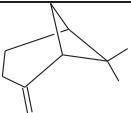
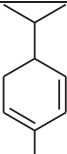
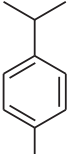
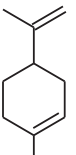
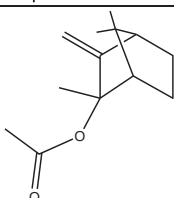
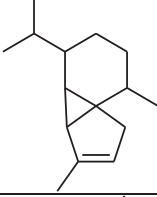
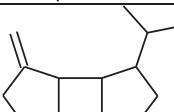
En otros análisis que se realizaron de otros aceites esenciales de la misma planta de diferente colecta se encontraron los mismos componentes pero en proporciones mayores, por ejemplo el 1-R- α -pineno llego a alcanzar un porcentaje de 37% y el α -felandreno el 14%.

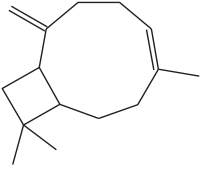
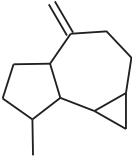
En otros análisis que se realizaron de otros aceites esenciales de la misma planta de diferente colecta se encontraron los mismos componentes pero en proporciones mayores, por ejemplo el 1-R- α -pineno llego a alcanzar un porcentaje de 37% y el α -felandreno el 14%.



Figura 5. Cromatograma de la fracción hidrofóbica del aceite esencial de las hojas de *E. glabratum*

Cuadro 2. Listado de Compuestos principales encontrados en fracción hidrofóbica del aceite esencial de las hojas de *E. glabratum* analizada por cromatografía de gases acoplado a masas.

Tiempo de retención	Porcentaje (%)	Nombre	Estructura química o número de compuestos encontrados	Reportado	Referencia
5.96	28.23	1R- α -Pineno		Sobre lechuga, cebolla, rábano, tomate	Friedman(1987), Müller <i>et al</i> (1964) Müller y Müller(1964) citados por Anaya A.L 2003
6.29	1.46	Camfeno		No reportado	-----
6.83	3.07	(-)- β - Pineno		Sobre lechuga y <i>Amaranthus retroflexus</i> L.	Al Saadawi <i>et al</i> (1985), Müller <i>et al</i> (1964) Müller y Müller(1964) citados por Anaya A.L 2003
7.04	2.02	No identificado	2 compuestos	-----	-----
7.46	6.81	α -Felandreno		No reportado	-----
7.74	2.10	<i>p</i> -Cimeno		Sobre lechuga y rábano	Vaughn y Boydston (1997) citado por Anaya en 2001
7.95	1.08	D-Limoneno		Sobre lechuga, cebolla, zanahoria, tomate,	Bradow y Connick (1990), Jordan <i>et al</i> .(1992-1993) citados por Anaya A.L 2003
14.40	4.48	2- Bornil acetato		No reportado	-----
16.38	0.63	α - Cubebeno		No reportado	-----
17.26	0.92	β -Baubareno		No reportado	-----

18.17	4.98	Cariofileno		No reportado	-----
18.60	0.93	L-Aloaromandreno		No reportado	-----
19.54	5.75	No identificado	10 compuestos	-----	-----
19.61	2.49	No identificado	3 compuestos	-----	-----
20.03	6.91	No identificado	3 compuestos	-----	-----
20.55	3.94	No identificado	2 compuestos	-----	-----

7.1.2 Análisis químico de fracción hidrofílica

De la fracción hidrofílica solo se lograron separar 5 compuestos puros de los cuáles solo 3 fueron identificados, el resto se encontró en mezcla (Cuadro 3). En el cromatograma se observa (Fig. 6) que los picos son poco abundantes comparados con los del cromatograma de la fracción hidrofóbica (Fig. 4).

De los compuestos puros encontrados en esta fracción, solamente α -terpineol ha sido reportado en otros estudios como aleloquímico⁴⁴.

En las colectas de junio y julio, ésta fracción del aceite esencial varió en su composición química: el componente mayoritario es 1-S- α - pineno (18%). La variación también se observó en la respuesta de las semillas de *L. sativa*, pues estas fracciones no tuvieron efectos alelopáticos.

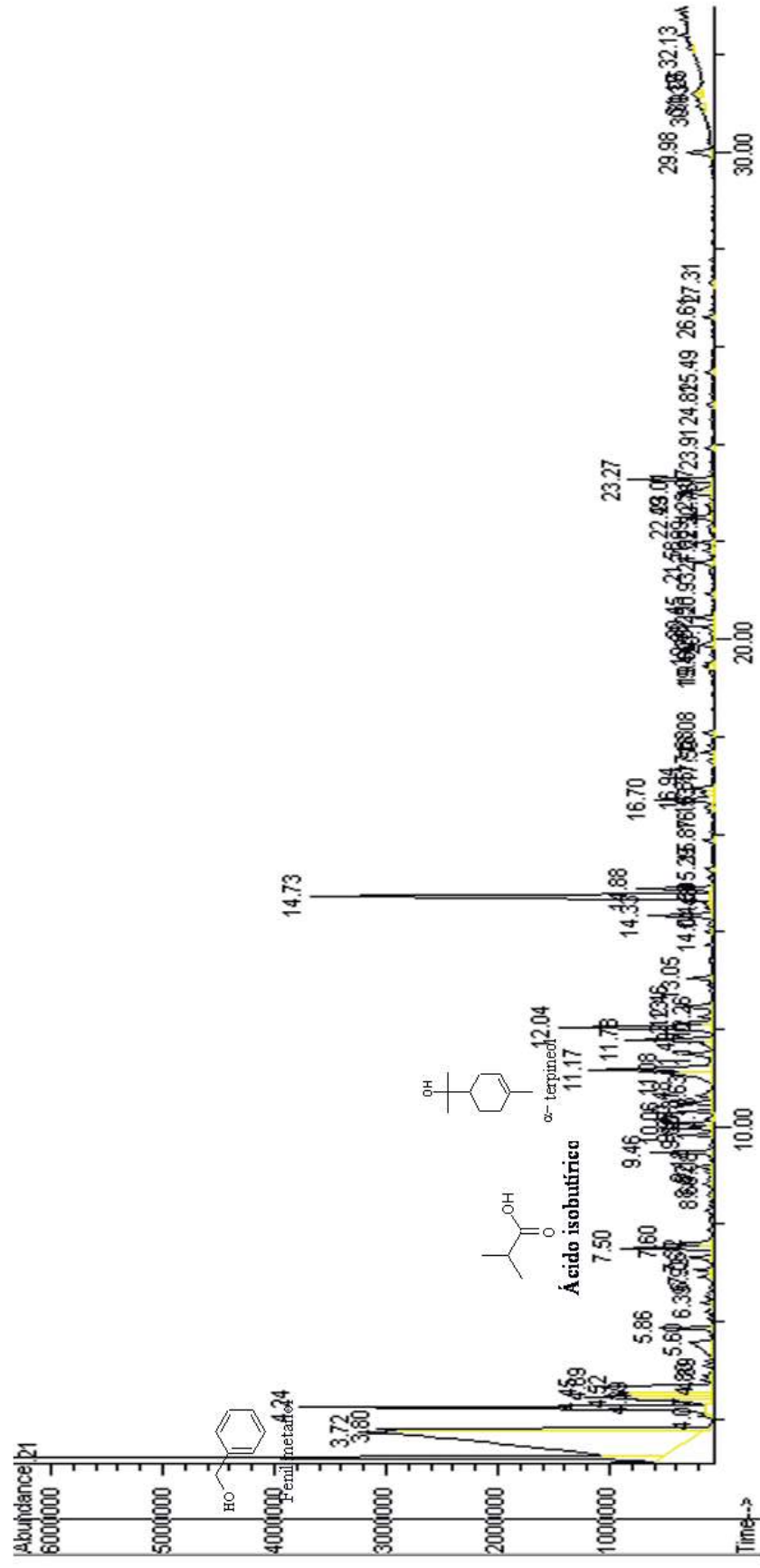
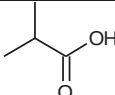
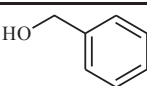
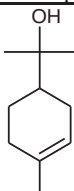


Figura 6. Cromatograma de fracción hidrofílica del aceite esencial de *E. glabratum* reextraída con AcOEt.

Cuadro 3. Compuestos encontrados en parte hidrofílica del aceite esencial de *E. glabratum* analizada por cromatografía de gases acoplado a masas

Tiempo de retención	Porcentaje (%)	Nombre	Estructura química o número de compuestos encontrados	Reportado	Referencia
3.21	7.713	No identificado	2 compuestos	-----	-----
3.72	30.054	No identificado	4 compuestos	-----	-----
3.80	4.259	Ácido isobutírico		No reportado	-----
4.24	6.56	No identificado	2 compuestos	-----	-----
4.45	2.519	No identificado	C ₅ H ₁₀ O ₂	-----	-----
4.52	1.689	No identificado	2 compuestos	-----	-----
4.69	4.49				-----
7.50	1.296	Fenil metanol		No reportado	-----
11.17	2.65	No identificado	3 compuestos	-----	-----
11.78	1.28	α-Terpineol		Contra Lechuga	Vokou y col. (2003)
14.73	9.188	No identificado	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	-----	-----

7.2 Bioensayos

7.2.1 Fracción hidrofóbica

7.2.1.1 Efecto de la fracción hidrofóbica del aceite esencial sobre semillas y plántulas de *Lactuca sativa*

a) Tasa de germinación

No fue muy afectada, los tratamientos 0, 1, 2, 3 alcanzaron prácticamente el 100 % de germinación (Fig. 7a, Fig. 7b y Fig. 7c). Se observa en (b) y (c) que las semillas expuestas a 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ tuvieron una germinación menor al resto de los tratamientos.

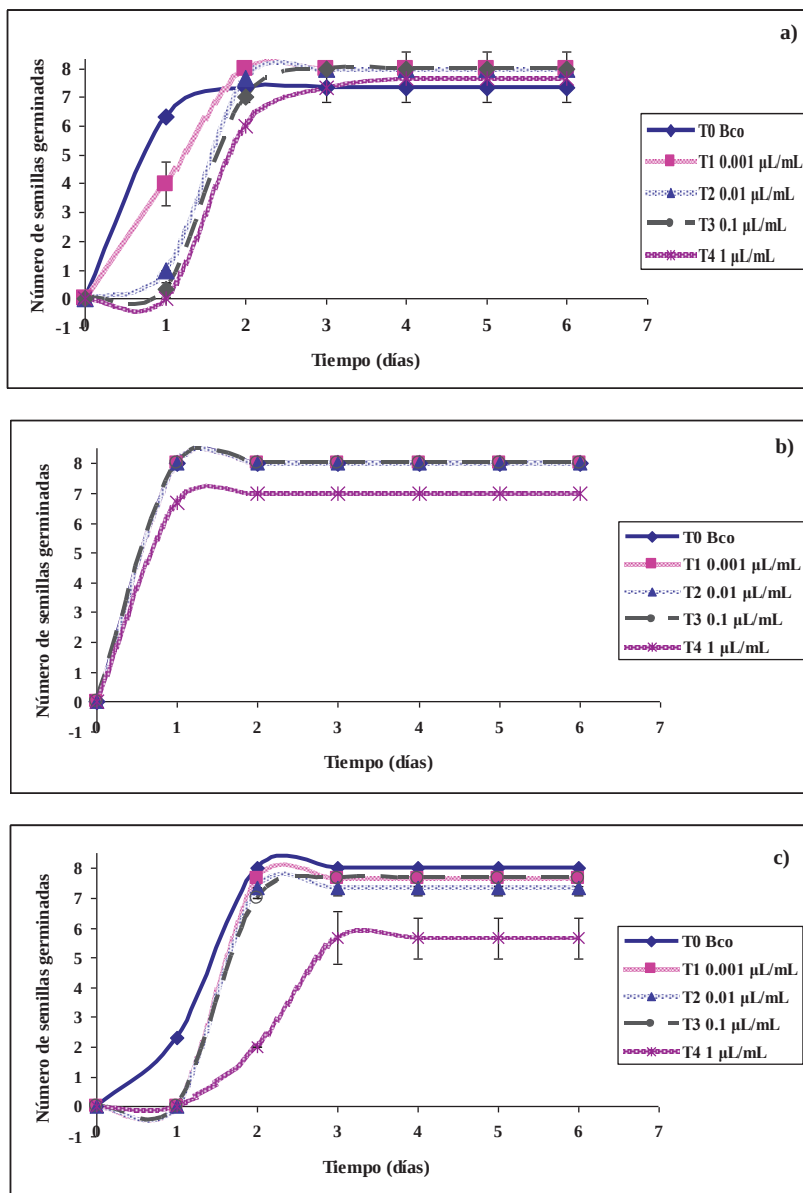


Figura 7. Tasas de germinación de semillas de *Lactuca sativa* sometidas a cuatro concentraciones (T1-T4) de la fracción hidrofóbica del aceite esencial de *E. glabratum*, mas un tratamiento control (T0). Las graficas (a), (b) y (c) corresponden a los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente y las barras indican el intervalo de confianza.

b) Germinación y desarrollo de las semillas

Radícula

Los datos obtenidos del ANOVA en el Cuadro 4 indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos y también entre los experimentos. El 70 % de la variación está explicada por la concentración de aceite esencial, mientras que la variación restante se explica por el experimento (20%) y la interacción entre estas dos variables (7.1%).

Cuadro 4. Analisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en radícula de semillas de *L. sativa* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas. Los datos de concentración se expresaron en logaritmos.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	132.2	2	66.1	7.27	0.003*
Log conc	919.3	4	229.8	25.26	0.000*
Experimento*log conc	187.0	8	23.4	2.57	0.029*
Error	272.94	30	9.10		

El crecimiento de la radícula fue similar en los tres experimentos (Fig. 8), excepto el testigo del experimento 3, en el cual hay diferencias significativas, y se observa que el crecimiento a la dosis más alta está por debajo del tamaño alcanzado en los otros experimentos.

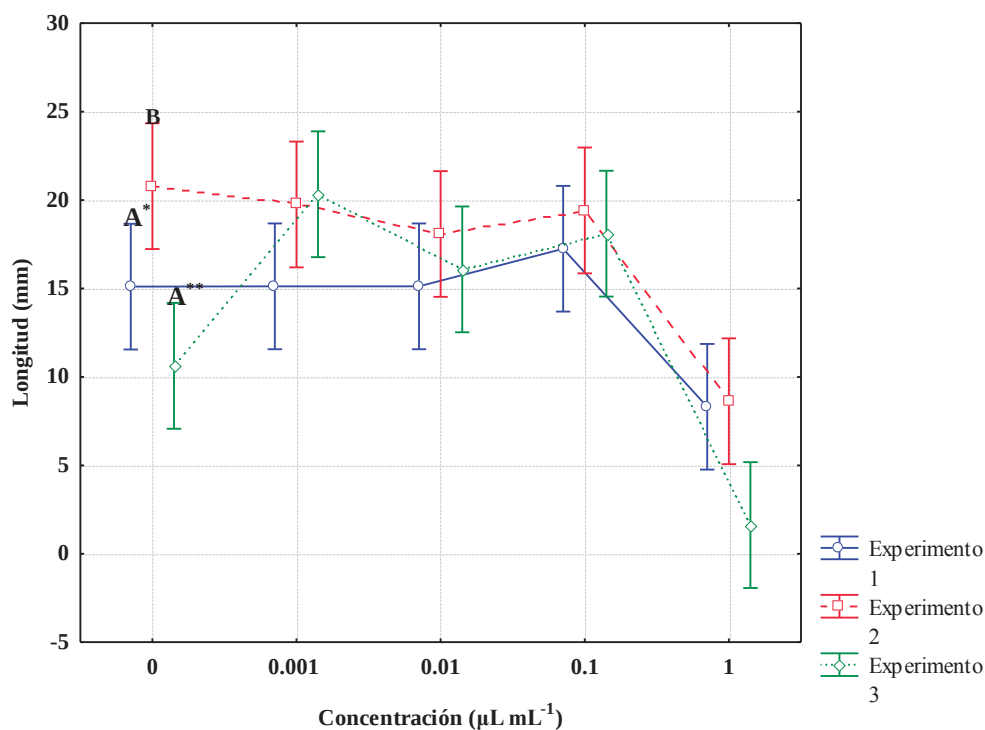


Figura 8. Experimentos 1, 2 y 3 de desarrollo y crecimiento de radícula en semillas de *L. sativa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$)

En la Fig. 9 se observa que la radícula a la dosis más alta (A) tiene un crecimiento muy por debajo de los otros tratamientos (B), los cuales alcanzaron longitudes similares. Las radículas de semillas de lechuga fueron inhibidas en su crecimiento un 60% con respecto al control bajo la dosis de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de aceite esencial de *E. glabratum*. Estas diferencia se encontraron mediante la prueba de Tukey: A(1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ B(0, 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

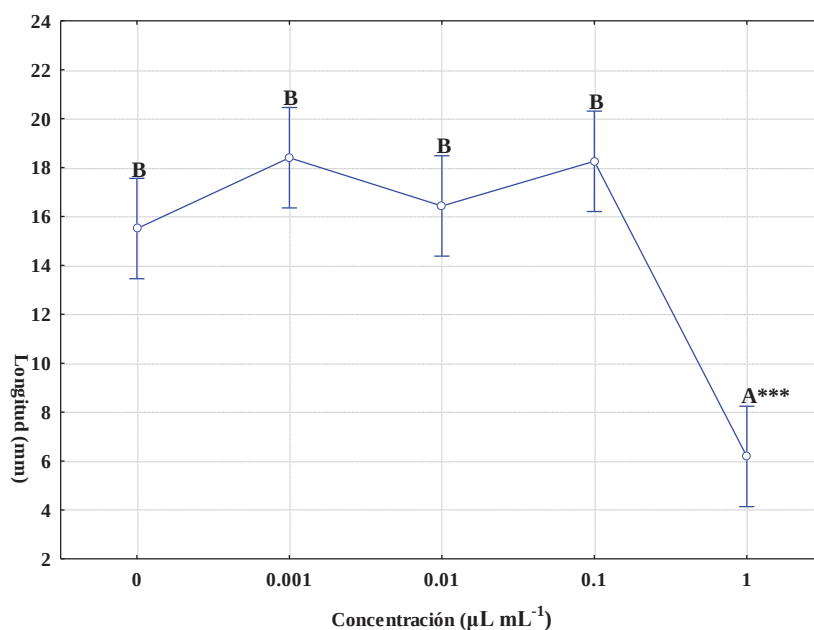


Figura 9. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de germinación y crecimiento (mm) de radícula en semillas de *L. sativa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

Hipocótilo

En el caso de hipocótilo los valores de crecimiento obtenidos en ANOVA indican (Cuadro 5) que los tres experimentos tienen similitud, ya que los valores de p en la concentración son significativos. Sin embargo las diferencias están dadas principalmente por la concentración en MS (93%).

Cuadro 5. Analisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en hipocótilo de semillas de *L. sativa* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	79.09	2	39.54	0.8786	0.425776
Log concentración	6904.93	4	1726.23	38.3540	0.000000
Experimento*log concentración	229.28	8	28.66	0.6368	0.740594
Error	1350.23	30	45.01		

El crecimiento del hipocotilo en los tres experimentos fue similar, se observa (Fig. 10) que en ellos, el tratamiento de mayor dosis tiene menor crecimiento.

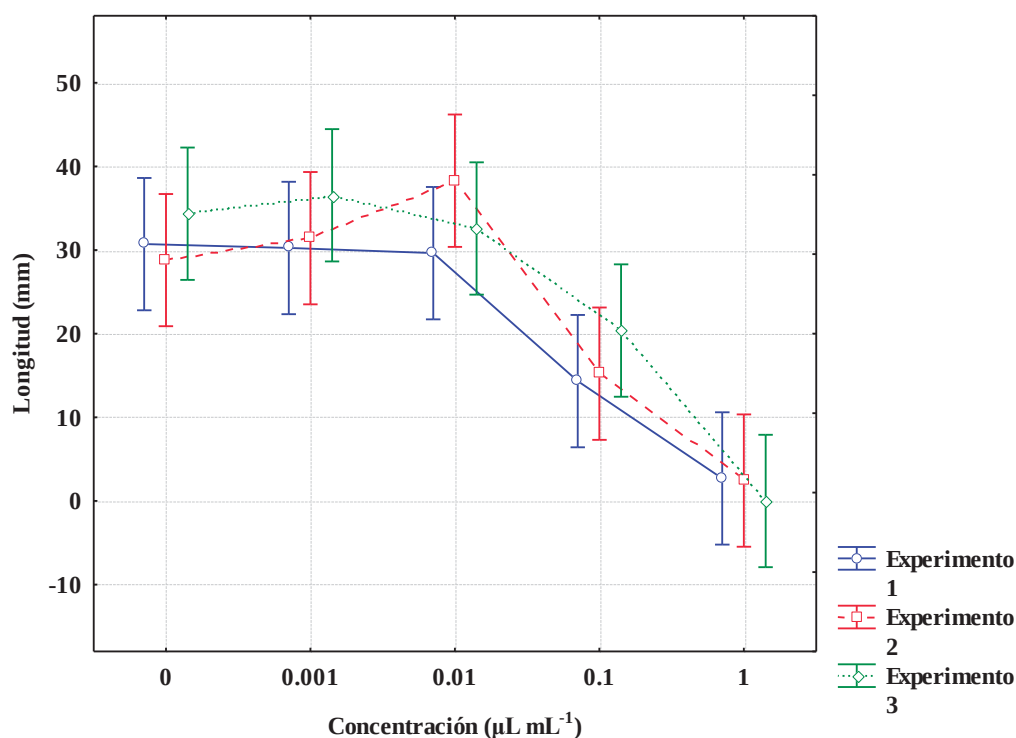


Figura 10. Experimentos 1, 2 y 3 de desarrollo y crecimiento de hipocótilo en semillas de *L. sativa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Se determinó mediante análisis de Tukey que $A(1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq B(0.1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq C(0.01, 0.001, 0 \mu\text{L mL}^{-1})$.

En la grafica (Fig. 11) se observa que la inhibición de los hipocótilos para el tratamiento (A) es de 95% y de 51% para (B). El valor de p (Cuadro 6) indica que hay diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y que el desarrollo de hipocótilo en semillas de lechuga es inhibido de un del 51-95% en intervalos concentración de 0.1 a 1 $\mu\text{L/mL}$ de aceite esencial.

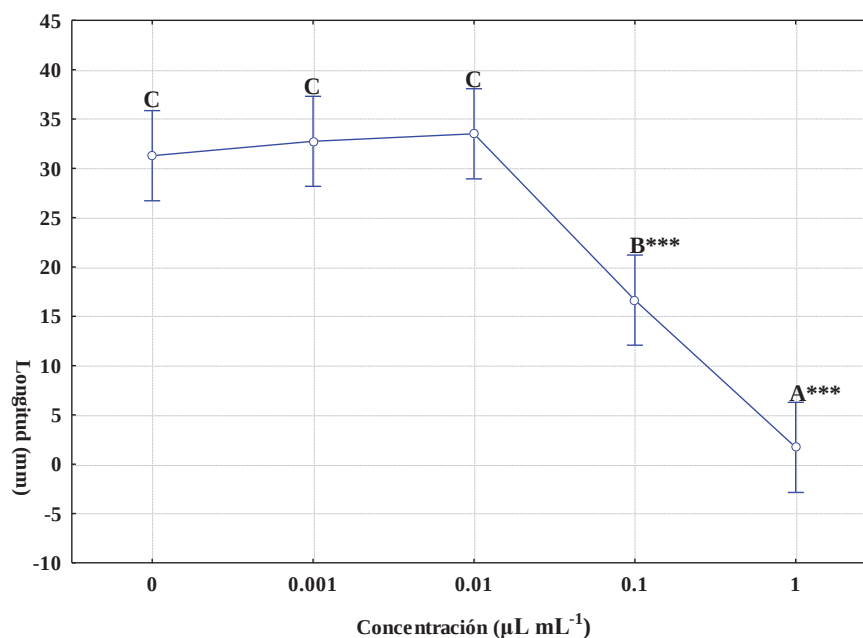


Figura 11. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de germinación y crecimiento (mm) de hipocótilo en semillas de *L. sativa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

c) Efectos sobre crecimiento temprano de semillas germinadas

Radícula

ANOVA. Los valores de p son significativos en la concentración, factor que explica el 93.57% de la varianza (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en radícula de plántulas de *L. sativa* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	36.19	2	18.10	2.078	0.142879
Log concentración	2061.90	4	515.47	59.181	0.000000
Experimento*log concentración	68.68	8	8.58	0.986	0.466443
Error	261.30	30	8.71		

En la grafica (Fig. 12) se observa que la radícula de las plántulas se comporta similar en los tres experimentos, excepto en las concentraciones 0.001-0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$, sin embargo no hay diferencias significativas.

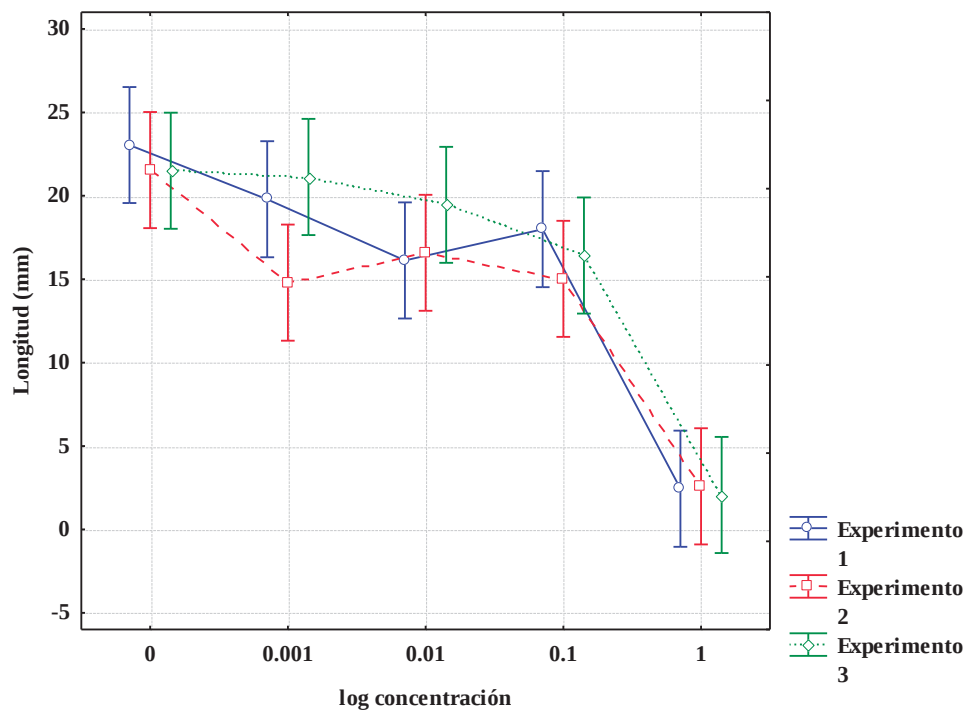


Figura 12. Experimentos 1, 2 y 3 de de crecimiento temprano de radícula en plántulas de *L. sativa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$)

En la prueba de Tukey se determinó que: A(1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ B (0.1, 0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ C (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) y CB (0.001 $\mu\text{L mL}^{-1}$) = C y B; como se muestra en la Fig. 13. En esta grafica (Fig. 13) se observa un efecto tipo umbral, en cual las radículas de las plántulas expuestas al tratamiento control (C) se desarrollan mejor que los otros tratamientos y al aumentar la dosis (A) el crecimiento disminuye. Hay diferencias de A con respecto a B y de esta con C. El valor de p (Cuadro 6) indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos y que el crecimiento temprano de radícula en plántulas de lechuga es inhibido 89.52% a concentración de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ y de 15-25 % a rangos de concentración de 0.001-0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

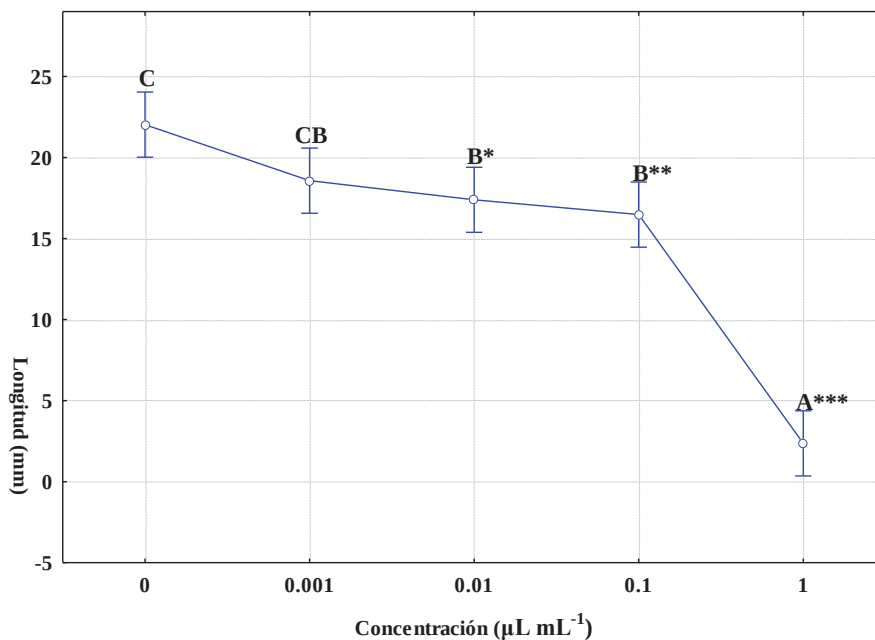


Figura 13. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de crecimiento temprano (mm) de radícula en plántulas de *L. sativa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

Hipocótilo

ANOVA. Los valores de p de la concentración (Cuadro 7) fueron muy significativos y la varianza esta dada (97%) por este factor.

Cuadro 7. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en hipocótilo de plántulas de *L. sativa* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	77.20	2	38.60	1.8538	0.174141
Log concentración	8366.61	4	2091.65	100.4588	0.000000
Experimento*log concentración	52.67	8	6.58	0.3162	0.953660
Error	624.63	30	20.82		

El crecimiento del hipocótilo en los tres experimentos fue prácticamente igual (Fig 14), el tratamiento de mayor dosis (1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) tuvo poco crecimiento en los tres casos.

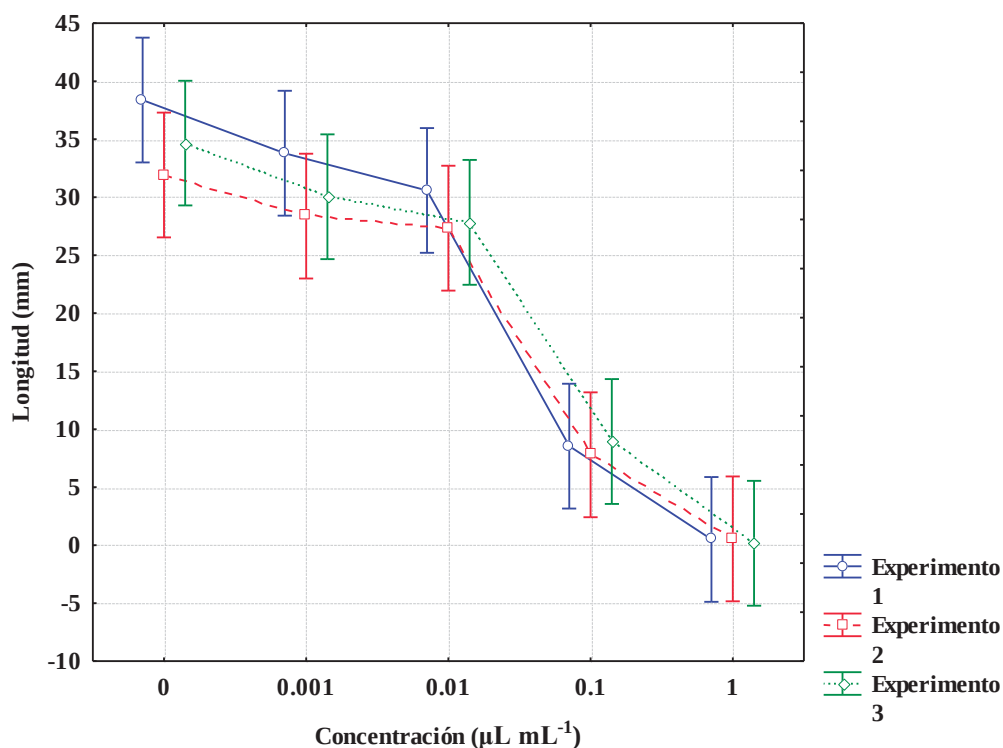


Figura 14. Experimentos 1, 2 y 3 de crecimiento temprano de hipocótilo en plántulas de *L. sativa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$)

Los resultados del análisis Tukey indican que existen diferencias entre los tratamientos: $A(1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq B(0.1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq C(0.01 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq D(0 \mu\text{L mL}^{-1})$ y $CD(0.001 \mu\text{L mL}^{-1}) = C$ y D .

En la gráfica (Fig. 16) se observa que el crecimiento temprano de hipocótilo en plántulas de *L. sativa*, es inhibido gradualmente conforme aumenta la concentración de aceite esencial. Por otra parte se observa que los hipocótilos del tratamiento control crecieron más que el resto de tratamientos. A la dosis de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ el desarrollo de las plántulas se detiene; a 0.1 $\mu\text{L/mL}$ se inhibe 76 % y a 0.01-0.001 $\mu\text{L mL}^{-1}$ el crecimiento se inhibe del 12-18 %.

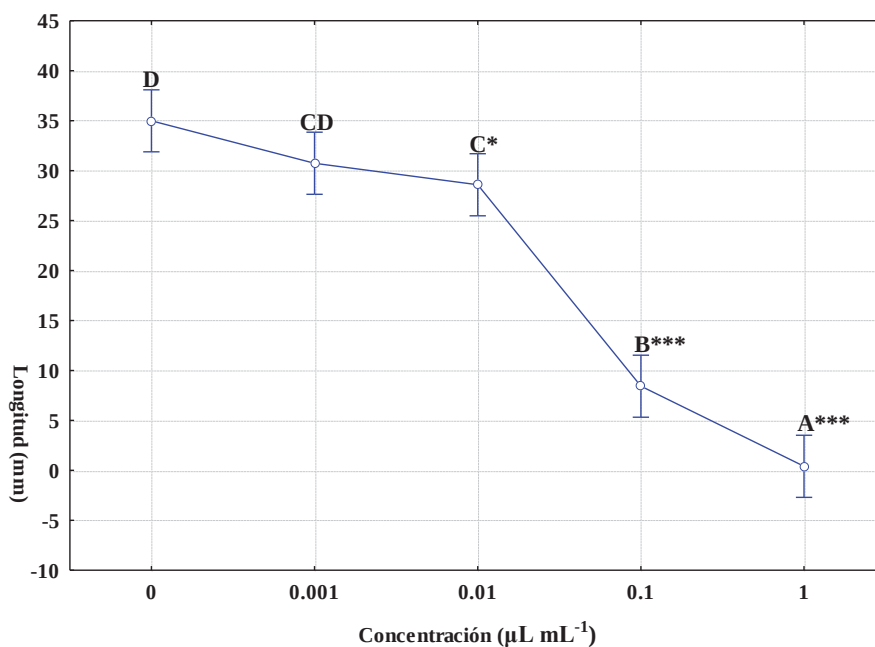


Figura 15. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de crecimiento temprano (mm) de hipocótilo en plántulas de *L. sativa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹). * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001.

En los experimentos de germinación y crecimiento de semillas, se observó que las semillas del tratamiento control, no crecieron más que todos los tratamientos que eran expuestas a una dosis de aceite esencial, en algunos de los experimentos se vió que a dosis de 0.001-0.01 µL mL⁻¹ las semillas eran estimuladas en su crecimiento (Fig 9 y 11).

Cuando las semillas fueron previamente germinadas y no se expusieron al aceite esencial, el crecimiento alcanzó mayor tamaño como se esperaba, se observó un comportamiento dependiente de la dosis (Fig. 10 y 12).

7.2.1.2 Efecto de la fracción hidrofóbica del aceite esencial de *E. glabratum* sobre semillas y plántulas de *Pinus oocarpa*

a) Tasa de germinación

La germinación de *P. oocarpa* a la concentración de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$, fue la más afectada en los tres experimentos (Fig. 16 (a), (b) y (c)), y el tratamiento control (T0) tuvo ligeramente mejor germinación. Las semillas comenzaron a germinar a partir del tercer o cuarto día, y se registro se crecimiento durante 9 días en los experimentos 1 y 2, y por 10 días en el experimento 3 (c).

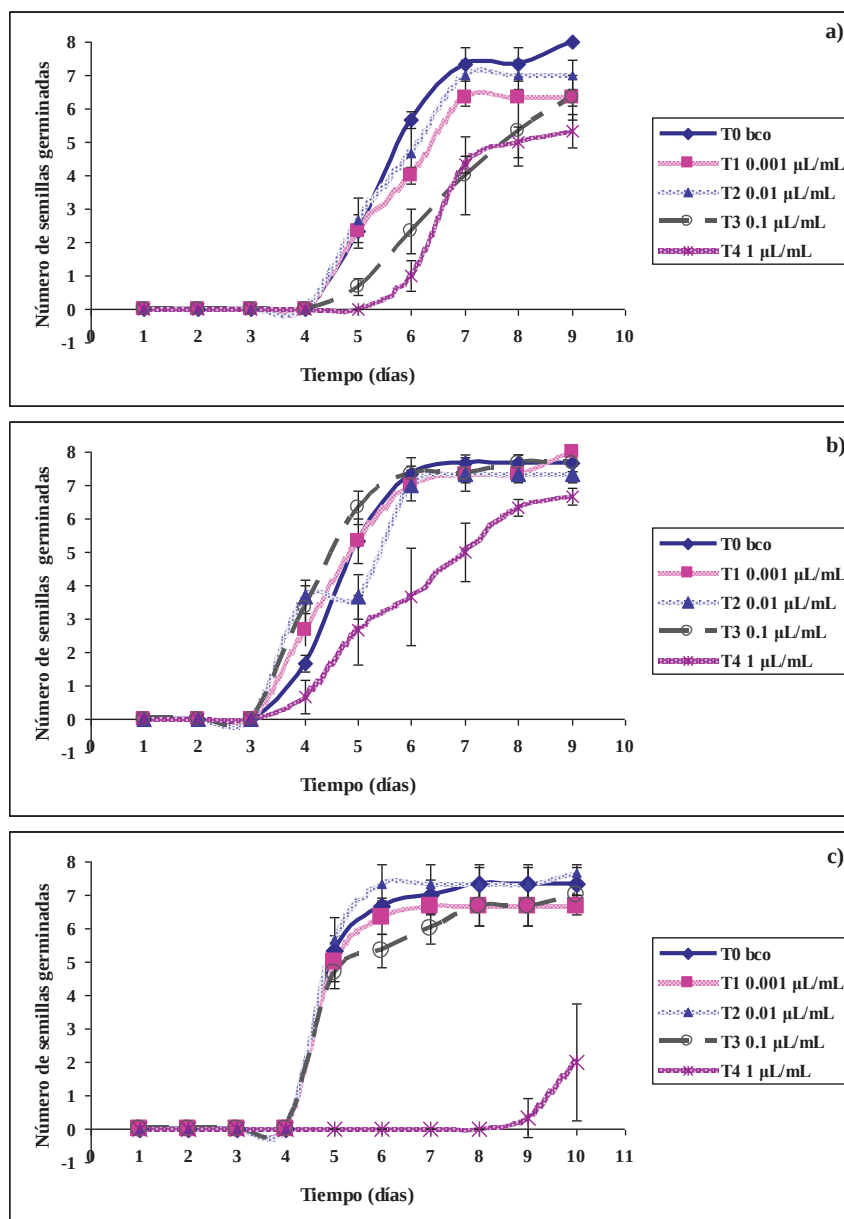


Figura 16. Tasas de germinación de semillas de *Pinus oocarpa* sometidas a 4 concentraciones distintas (expresadas en μL) T1-T4, de fracción hidrofóbica de aceite esencial mas un tratamiento control (T0). Las gráficas (a), (b) y (c) corresponden a los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente y las barras, indican el intervalo de confianza.

b) Germinación y desarrollo de semillas

Radícula

Las graficas de germinación resultaron muy diferentes entre si, por lo que se hizo una grafica de regresión lineal con los datos (Fig. 17), grafica donde se observa que la dispersión de los valores del crecimiento de radícula tienen una correlación baja con la concentración del aceite esencial. La asociación entre la variable dependiente (longitud promedio de radícula) e independiente (logaritmo de la concentración) es muy baja. El valor de $R^2 = 0.3531$, nos indica que la variación depende de otros factores no considerados en el experimento.

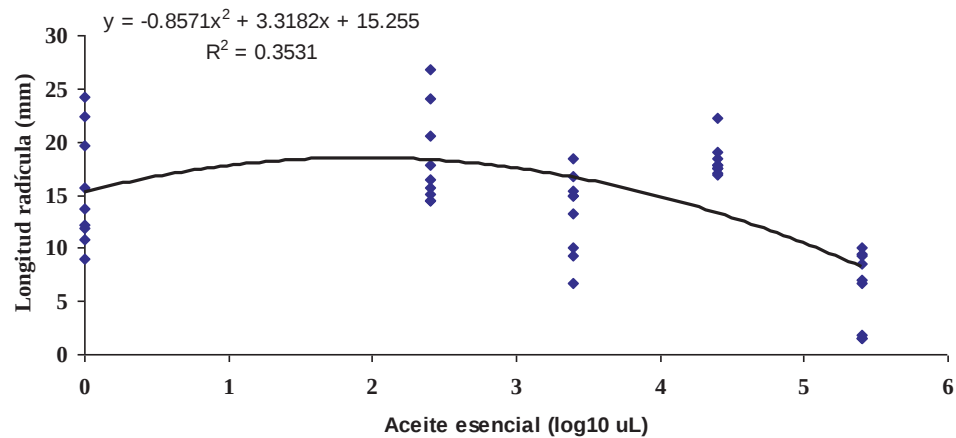


Figura 17 Grafica de correlación de los experimentos de germinación y desarrollo de radícula de semillas de *P. oocarpa*, expuestas a diferentes concentraciones de aceite esencial de *E. glabratum*.

Los valores de los tres experimentos se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis porque hubo mucha varianza en los experimentos. Este análisis resulto estadísticamente significativo ($p = 0.0001$) y como se observa en la grafica (Fig. 18), las radículas de semillas de *Pinus oocarpa* sufren una inhibición del crecimiento del 77% a concentraciones de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$. Así mismo, se observa que a rangos de concentración de 0.001 - $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$ la inhibición es gradual de 15-38 %.

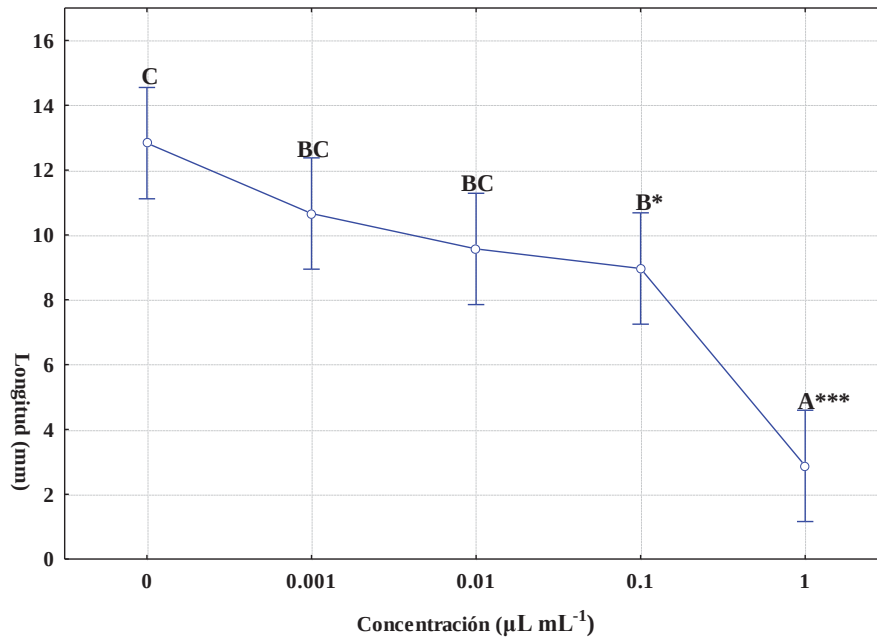


Figura 18. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de germinación y crecimiento (mm) de radícula en semillas de *P. oocarpa*, expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo ($0 \mu\text{L mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

Hipocótilo

En la grafica de correlación ente la concentración del aceite esencial y la longitud del hipocotilo (Fig. 19) se observa que la dispersión de los valores nos dan una buena correlación. La asociación entre la variable dependiente (longitud promedio hipocótilo) e independiente (log concentración) es buena. El valor de $R^2 = 0.7766$ indica que la variación se explica en un 77%.

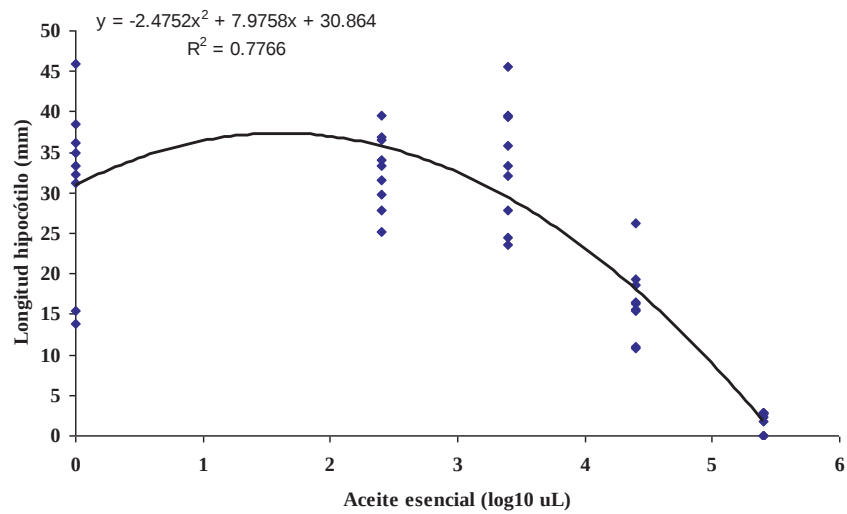


Figura 19. Gráfica de correlación en experimentos de germinación y desarrollo de hipocótilo de semillas de *P. oocarpa* expuestas a diferentes concentraciones de aceite esencial de *E. glabratum*.

En el caso del crecimiento del hipocótilo de *P. oocarpa* el análisis Kruskal- Wallis resulto significativo estadísticamente ya que $p= 0.000$. En este experimento se observa (Fig. 20) que el desarrollo fue muy similar al de radícula, en el cual el tratamiento con dosis 1 $\mu\text{L/mL}$ mostró una inhibición alelopática de 84.61 % y en rangos de concentración de 0.1- 0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$ el efecto alelopático es gradual, 32-13 %.

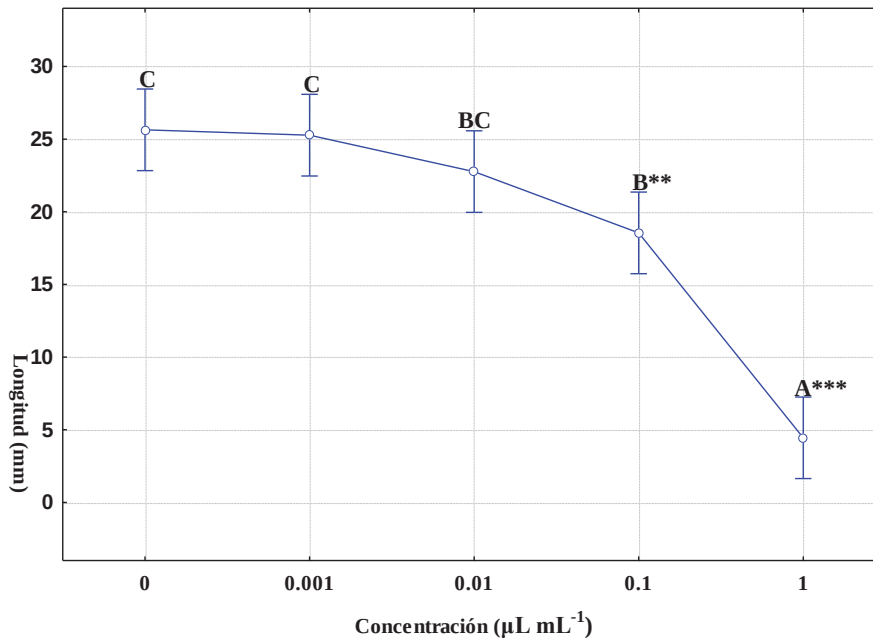


Figura 20. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de germinación y crecimiento (mm) de hipocótilo en semillas de *P. oocarpa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

c) Efectos sobre crecimiento temprano de semillas germinadas

Radícula

Los valores de p son significativos para la concentración. La significancia de los experimentos (Cuadro 8) esta dada en gran proporción (85.76%) por este factor.

Cuadro 8. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en radícula de plántulas de *P. oocarpa* de tres experimentos en cinco log de concentración distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	48.72	2	24.36	2.879	0.071836
Log concentración	993.17	4	248.29	29.343	0.000000
Experimento*log concentración	67.27	8	8.41	0.994	0.460773
Error	253.85	30	8.46		

El crecimiento de las semillas germinadas en los tres experimentos (Fig. 21) fue similar. En los tres experimentos se observa que el tratamiento control tiene un mejor desarrollo.

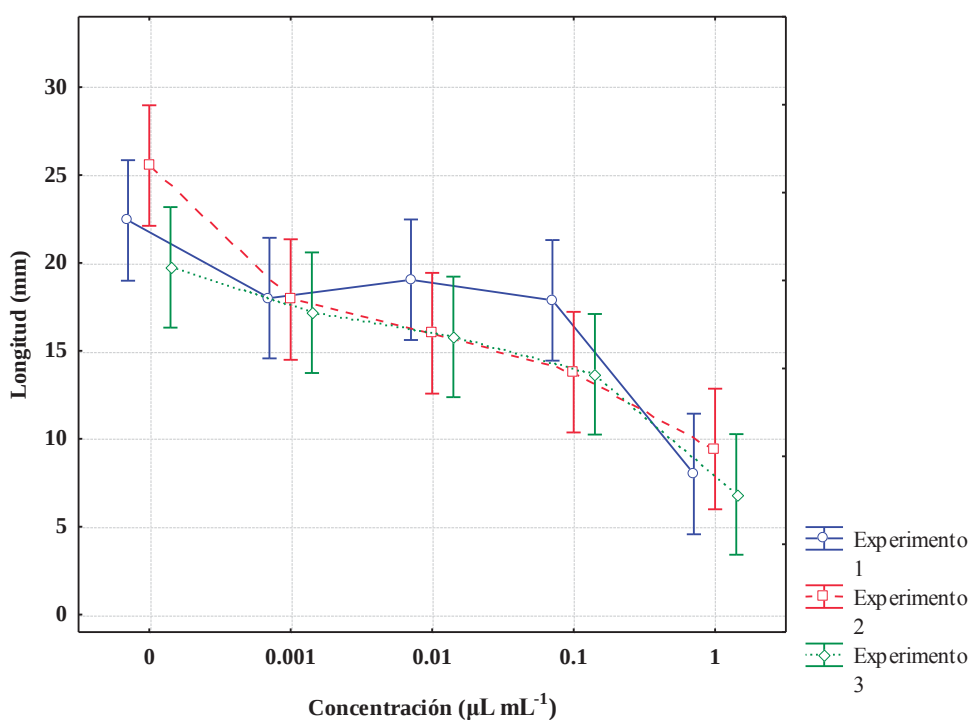


Figura 21. Experimentos 1, 2 y 3 de crecimiento temprano de radícula en plántulas de *P. oocarpa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹).

En el análisis de Tukey se observó que $A(1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq B(0.1, 0.01, 0.001 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq C(\text{testigo})$. A rangos de concentración de 0.001-0.1 µL mL⁻¹ (B) la inhibición radicular de las plántulas es del 22-33 %, y a dosis de 1 µL mL⁻¹ el desarrollo se inhibe 64.5 %.

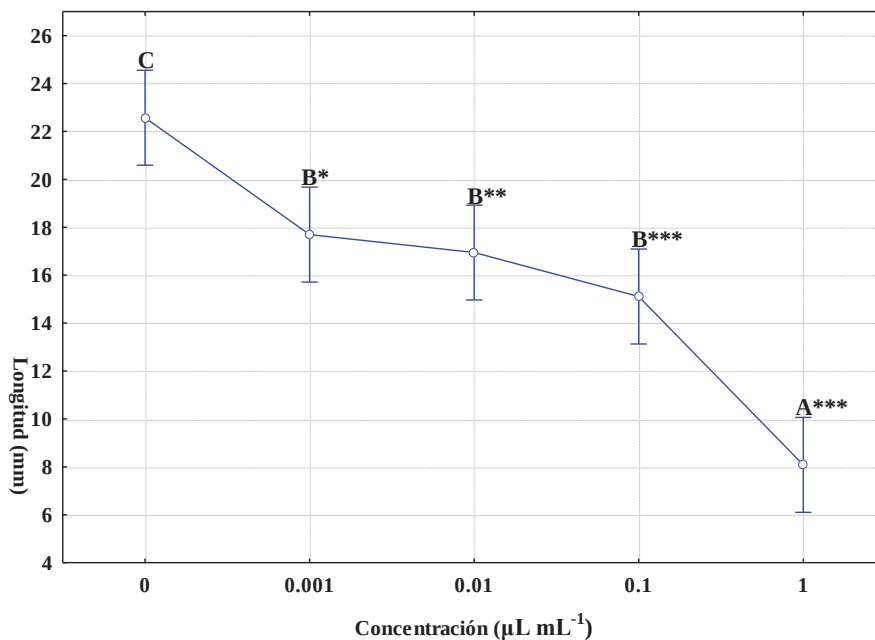


Figura 22 Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de crecimiento temprano (mm) de radícula en plántulas de *P. oocarpa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹). * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001.

Hipocótilo

En los efectos presentados en el Cuadro 9 se observa que casi la totalidad de las diferencias están dadas por la concentración (97.78 %). El valor de *p* es ampliamente significativo lo que indica que existen diferencias entre tratamientos debido a la concentración.

Cuadro 9. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en hiocótilo de pántulas de *P. oocarpa* de tres experimentos en cinco log de concentración distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	0.23	2	0.11	0.017	0.982715
Log concentración	3231.79	4	807.95	122.649	0.000000
Experimento*log concentración	92.71	8	11.59	1.759	0.125294
Error	197.63	30	6.59		

En la gráfica (Fig. 23) se observa que el crecimiento del hipocotilo de todos los tratamientos se comportó igual en los tres experimentos. No hay diferencias significativas entre experimentos.

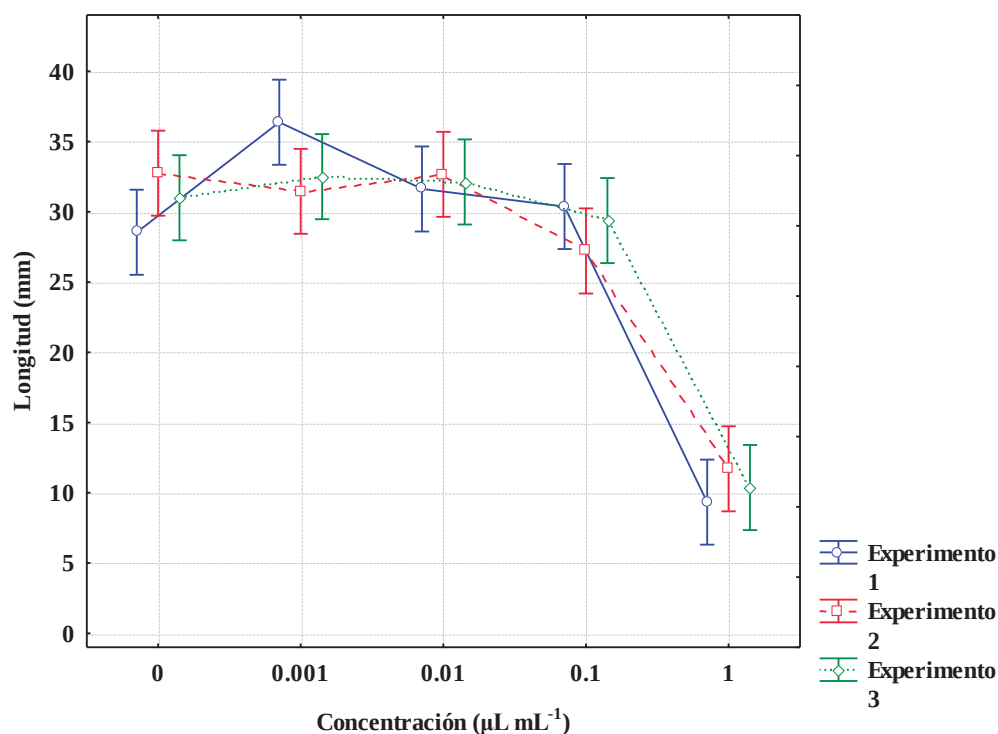


Figura 23. Experimentos 1, 2 y 3 de crecimiento temprano de hipocótilo en plántulas de *P. oocarpa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹).

Hay diferencias entre tratamientos de acuerdo con el valor de p y del análisis de Tukey, donde se determinó que: $A(1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq B(0.1 \mu\text{L mL}^{-1}) \neq C(0.001 \mu\text{L mL}^{-1})$ y $BC(0.01 \text{ y } 0 \mu\text{L mL}^{-1}) = B \text{ y } C$. En la grafica de los tres experimentos (Fig. 24), se observa que el tratamiento de mayor dosis (A) $1 \mu\text{L mL}^{-1}$, inhibió su desarrollo 68 %, y el resto de los tratamientos tuvieron tamaños de hipocótilos similares. Esto indican que el crecimiento temprano de plántulas de *P. oocarpa* solo es inhibido a dosis de $1 \mu\text{L/mL}$ de aceite esencial de *E glabratum*.

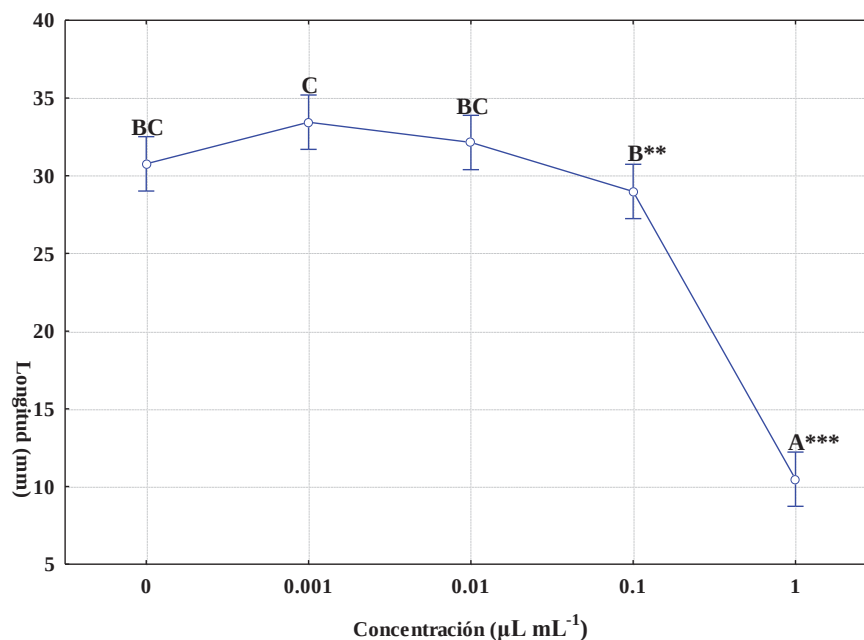


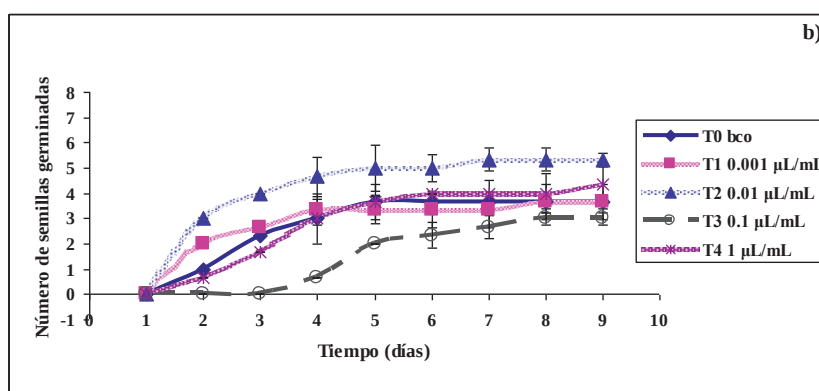
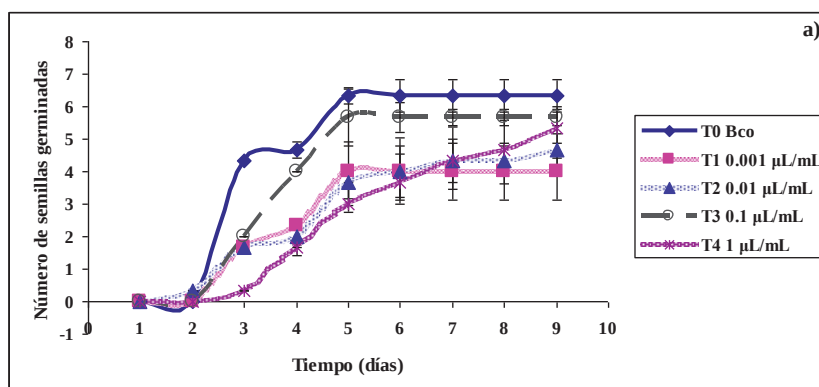
Figura 24. Promedio de los Experimentos 1, 2, y 3 de crecimiento temprano (mm) de hipocótilo en plántulas de *P. oocarpa* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

Las radículas e hipocótilos en experimentos con semillas no germinadas de *P. oocarpa* tuvieron mejor desarrollo cuando no eran expuestas al aceite esencial (Fig. 21 y Fig. 22), y que su desarrollo fue dependiente de la dosis. Los experimentos de radículas pregerminadas se comporto de igual manera (Fig. 23). Solo hubo variación en los experimentos de hipocótilos de semillas previamente germinadas, donde a dosis de 0.001 $\mu\text{L/mL}$ tuvo un mejor desarrollo (Fig. 24).

7.2.1.3 Efecto de la fracción hidrofóbica del aceite esencial de *E. glabratum* sobre semillas y plántulas de *Lupinus elegans*

a) Tasa de germinación

En ningún tratamiento de los tres experimentos se obtuvo el 100% de germinación, en general la germinación fue muy baja a pesar de que las semillas fueron previamente escarificadas. No se observan patrones de crecimiento, excepto en los experimentos 1 y 3 (Fig. 24 (a) y (c)). El tratamiento control en el experimento 2 produjo mejor germinación que el resto (Fig. 25 (b)) y el tratamiento 2 tuvo el mayor número de semillas germinadas. En el experimento 3 (Fig. 24 (c)) se utilizó un lote de semillas diferente de experimentos 1 y 2 el cual tardó cuatro días en comenzar a germinar, dos más que el anterior lote.



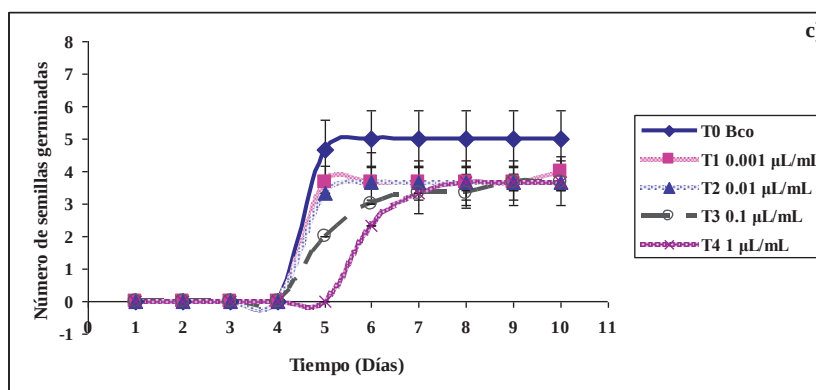


Figura 25. Tasas de germinación de semillas de *Lupinus elegans* expuestas a 4 concentraciones distintas T1-T4 de fracción hidrofóbica de aceite esencial mas un tratamiento control (T0). Las gráficas (a), (b) y (c) corresponden a los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente y las barras indican el intervalo de confianza.

b) Germinación y desarrollo de semillas

Radícula

ANOVA. Los datos de las mediciones de radícula de semillas de *L. elegans* (Cuadro 10) resultaron muy desviados, por tanto con márgenes de error grandes en MS (11%) debido en parte a que la tasa de germinación no alcanzo altos porcentajes.

Todos los tratamientos tuvieron un desarrollo similar, las diferencias se dieron en mayor proporción en función de la concentración (56.52%).

Cuadro 10. Analisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en radícula de semillas de *L. elegans* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	125.101	2	62.551	1.6486	0.209265
Log concentración	750.444	4	187.611	4.9448	0.003497
Experimento*log concentración	350.373	8	43.797	1.1543	0.357918
Error	1138.237	30	37.941		

Los experimentos y los tratamientos se comportaron similares: en la grafica (Fig. 26) se observa que solo en los experimentos 1 y 3 se repitió un patrón donde en el tratamiento control tuvo un mejor desarrollo, sin embargo no existen diferencias significativas.

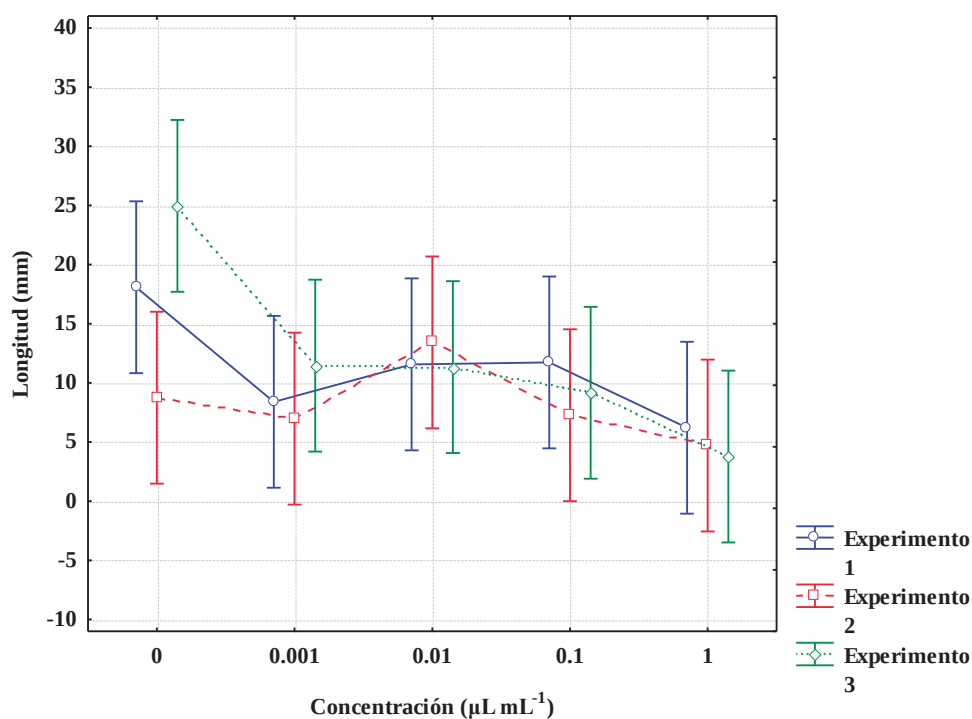


Figura 26. Experimentos 1, 2 y 3 de germinación y desarrollo de radícula en plántulas de *L. elegans* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo ($0 \mu\text{L mL}^{-1}$).

En el análisis de Tukey se determinó que solo hubo diferencias significativas entre A($1 \mu\text{L mL}^{-1}$) y B($0 \mu\text{L mL}^{-1}$). AB (0.1, 0.01 y $0.001 \mu\text{L mL}^{-1}$) = A y B. El tratamiento control ($0 \mu\text{L mL}^{-1}$) se desarrollo más exitosamente (Fig. 27).

Aunque se destaca que las radículas de las semillas de *L. elegans* tuvieron mejor desarrollo cuando no fueron expuestas al aceite esencial, y que a dosis de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ el crecimiento se inhibió 71.6 %, los márgenes de error fueron muy grandes. Aun así hay diferencias significativas entre tratamientos debidos a la concentración del aceite esencial.

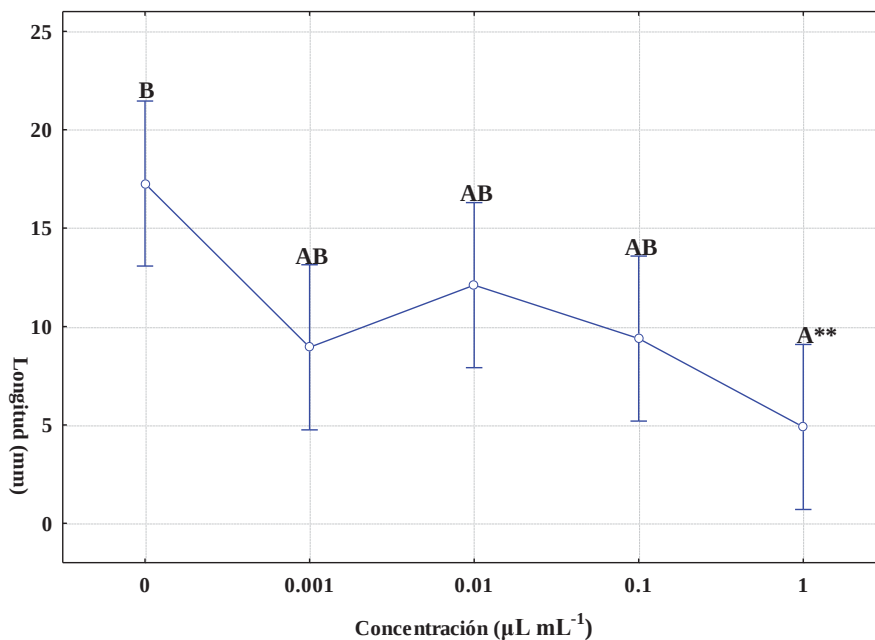


Figura 27 Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de germinación y crecimiento (mm) de radícula en semillas de *L. elegans* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹). * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001.

Hipocótilo

En estos experimentos también fueron grandes los márgenes de error (6.19 %) y los efectos sobre el crecimiento del hipocótilo (Cuadro 11) también son explicados en mayor proporción por la concentración (79.6 %).

Cuadro 11. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en hipocótilo de semillas de *L. elegans* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Log concentración	1527.134	4	381.784	12.8461	0.000003
Experimento*log concentración	252.037	8	31.505	1.0601	0.415988
Error	891.594	30	29.720		

Los experimentos se comportan de manera distinta, sin embargo en los tres solo se observa (Fig. 28) que en el experimento tres, el tratamiento de mayor dosis el desarrollo es prácticamente nulo.

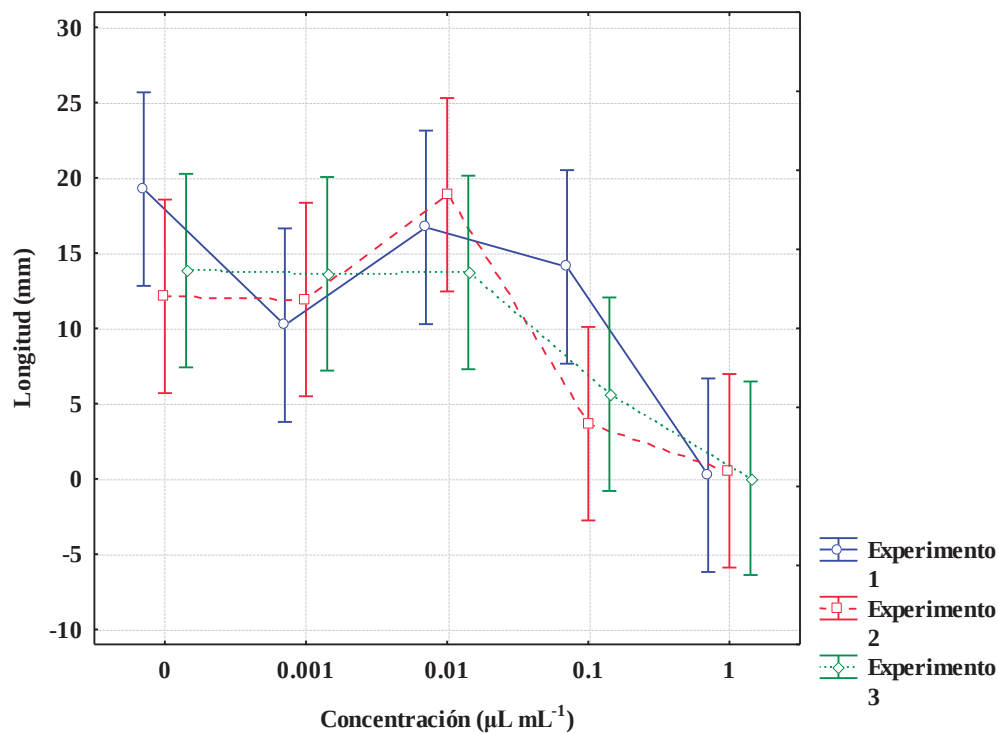


Figura 28. Experimentos 1, 2 y 3 de germinación y desarrollo de hipocótilo en semillas de *L. sativa* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$)

La prueba de Tukey nos determinó que: A (1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ B(0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ C(0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$) y BC(0.001, 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) = B y C.

En la grafica de crecimiento de hipocótilos de semillas de *L. elegans* (Fig. 29) se muestra que estas inhiben su desarrollo 98 % a dosis de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 48.24 % a 0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ y lo estimulan 9 % a dosis de 0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de aceite esencial de *E. glabratum*. Aunque los márgenes de error son grandes se puede determinar que hay un efecto alelopático.

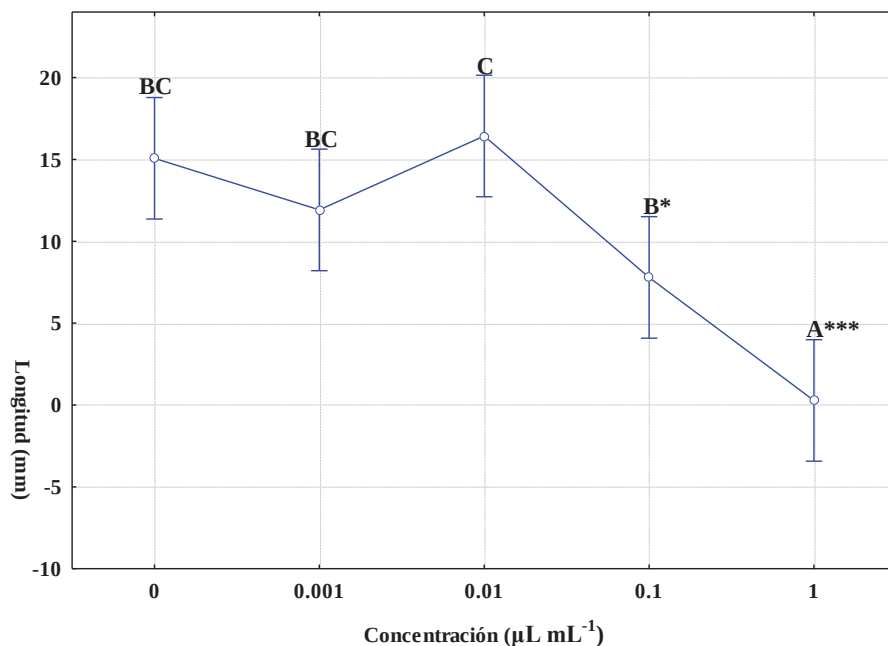


Figura 29. Experimentos 1, 2, y 3 promediados de germinación y crecimiento (mm) de hipocótilo en semillas de *L. elegans* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹). * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001.

c) Efectos sobre crecimiento temprano de semillas germinadas

Radícula

ANOVA. Al haber partido de semillas pre-germinadas, se obtuvieron datos más ordenados y con márgenes de error menores (6.75 %) que el experimento con semillas no germinadas en el caso de radícula. Los valores mostrados en el cuadro 12 indican que el valor de *p* es significativo en la concentración.

Cuadro 12. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en radícula de plántulas de *L. elegans* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	59.08	2	29.54	0.6045	0.552857
log concentración	2469.13	4	617.28	12.6325	0.000004
Experimento*log concentración	219.14	8	27.39	0.5606	0.801170
Error	1465.94	30	48.86		

Se encontró similitud en el comportamiento de todos los experimentos (Fig. 30). En los tres se observa que el crecimiento de las radículas de los tratamientos de mayor dosis es limitado (en promedio 5.57 mm).

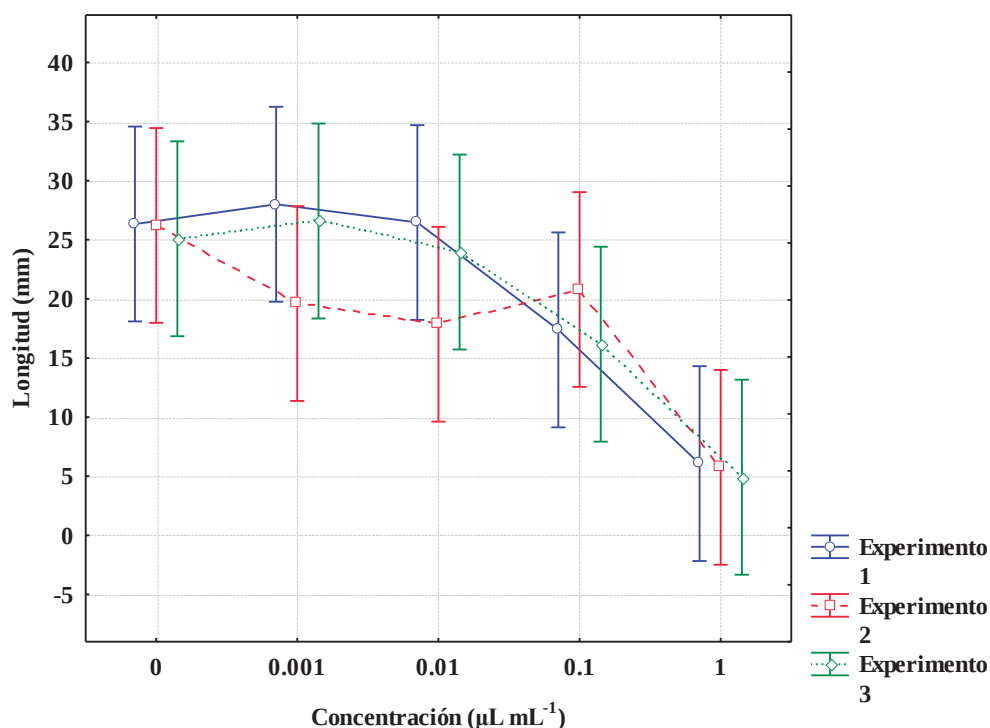


Figura 30. Experimentos 1, 2 y 3 de crecimiento temprano de radícula en plántulas de *L. elegans* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹).

Se encontró que el desarrollo temprano de radículas es dependiente de la concentración del aceite esencial, sin embargo se determino con el análisis Tukey que solo hay diferencias significativas entre el tratamiento A (1 µL mL⁻¹) con el resto B(0,0.001,0.01, 0.1 µL mL⁻¹)

El crecimiento temprano de radículas de semillas germinadas de *L. elegans* es inhibido 78.45 % a dosis de 1 µL mL⁻¹ de aceite esencial. También en rangos de 0.01 - 0.1 µL mL⁻¹ hay inhibición alelopática de 12-30 %.

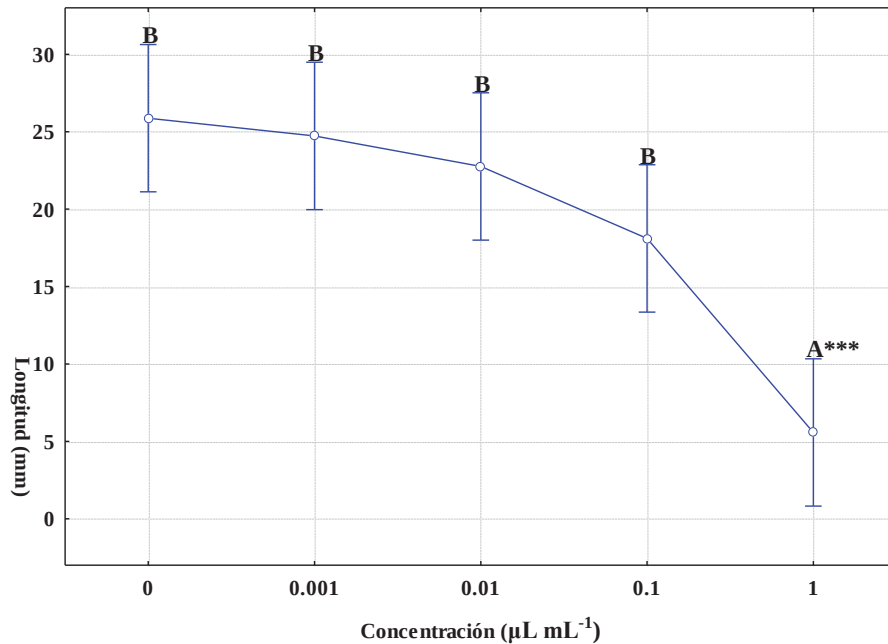


Figura 31. Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 promediados de crecimiento temprano (mm) de radícula en plántulas de *L. elegans* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹). * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001.

Hipocótilo

ANOVA. Al igual que el experimento anterior las diferencias están dadas en mayor proporción por la concentración (89.63 %). Los valores de *p* son significativos en concentración (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de varianza de las mediciones de promedio de longitud (mm) en hipocótilo de plántulas de *L. elegans* de tres experimentos en cinco concentraciones distintas.

Efecto	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Experimento	28.256	2	14.128	0.7674	0.473128
Log conc	1750.165	4	437.541	23.7651	0.000000
Experimento*log conc	150.465	8	18.808	1.0216	0.441570
Error	552.333	30	18.411		

Los tres experimentos se comportaron igual y no hubo diferencias significativas (Fig. 32).

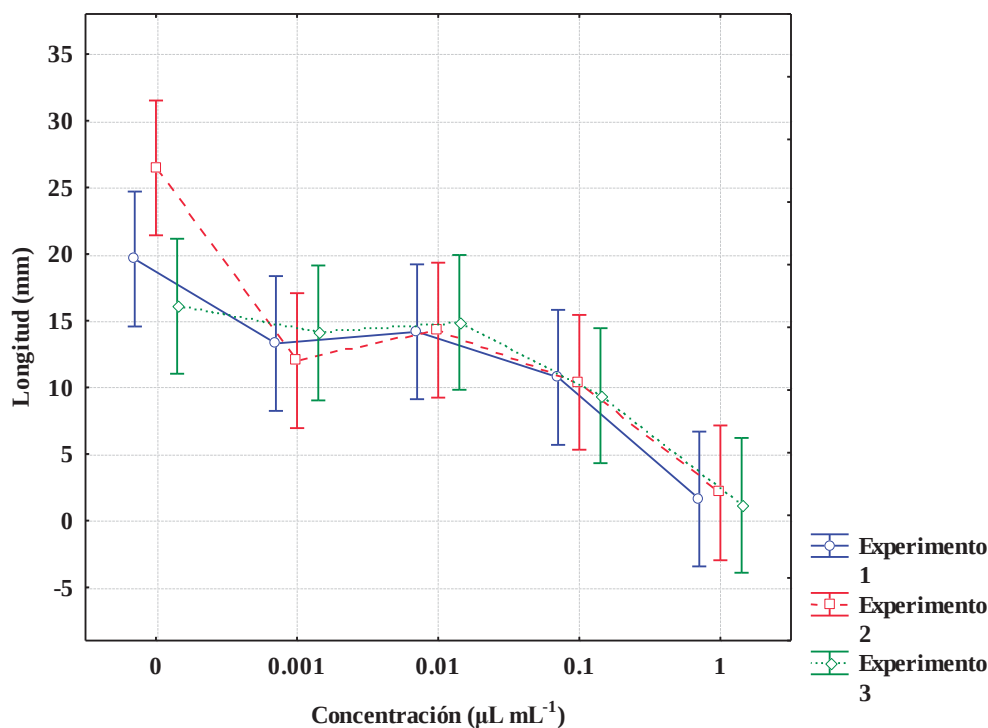


Figura 32. Experimentos 1, 2 y 3 de crecimiento temprano de hipocótilo en plántulas de *L. elegans* sometidas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

El análisis de Tukey nos determinó que: A (1 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ B(0.1, 0.01, 0.001 $\mu\text{L mL}^{-1}$) $\neq$ C(testigo).

En la gráfica (Fig. 33) se observa que el crecimiento de hipocótilo de las plántulas es inhibido 92 % a concentraciones de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, y 30-51 % a 0.001-0.1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Al no ser expuesta al aceite esencial, su desarrollo es más exitoso. Sin embargo el crecimiento temprano del hipocótilo de plántulas de *L. elegans* sufre un efecto alelopático a rangos de concentración de 0.001 a 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ siendo gradual este efecto.

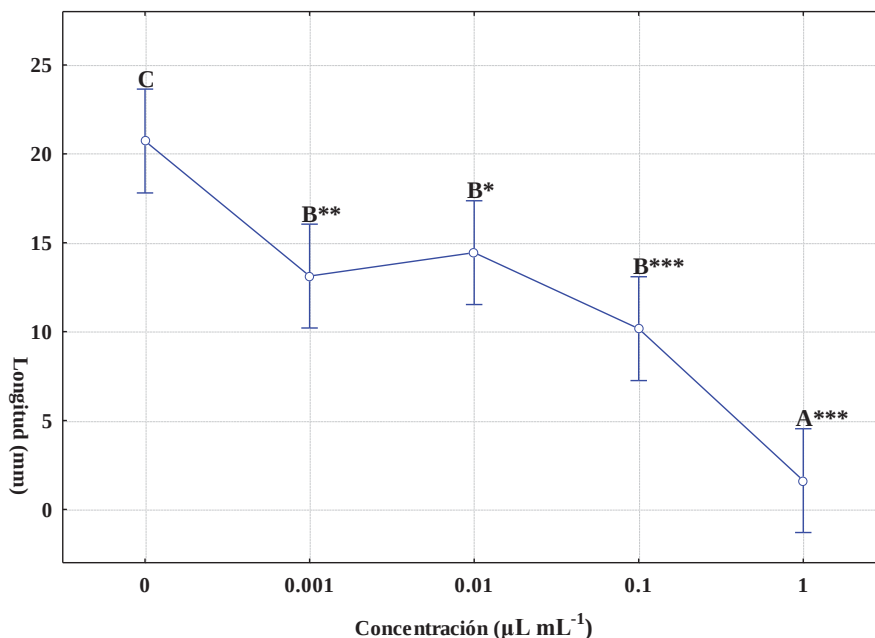


Figura 33 Promedio de los experimentos 1, 2, y 3 de crecimiento temprano (mm) de hipocótilo en plántulas de *L. elegans* expuestas a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 µL mL⁻¹) de aceite esencial de *E. glabratum* mas un testigo (0 µL mL⁻¹). * P< 0.05 ** P<0.01 ***P<0.001.

Esta especie se comporto de manera muy heterogénea por lo que los márgenes de error fueron muy grandes. El único patrón que se observó en los experimentos sobre radículas con semillas pre-germinadas y no germinadas (Fig. 27 y Fig. 31), además de hipocótilos de semillas no germinadas (Fig. 29), fue que las semillas que no fueron expuestas al aceite esencial tuvieron mejor crecimiento y las semillas expuestas a la mayor dosis fueron las más inhibidas en su crecimiento. Por otra parte los hipocótilos de semillas no germinadas, fueron estimulados en su crecimiento un 9 % a dosis de 0.01 µL mL⁻¹ (fig. 33).

7.2.2 Fracción hidrofílica/ Agua proveniente de arrastre de vapor (A.Arr)

7.2.2.1 Efecto de la fracción hidrofílica (A.Arr) del aceite esencial sobre semillas y plántulas de *Lactuca sativa*

a) Tasa de germinación

La fracción hidrofílica del aceite esencial resultó muy dañina para la germinación de semillas de *L. sativa*. Se observa en los tres experimentos (Fig. 34 (a), (b) y (c)) desde el primer día la germinación del tratamiento control fue del 100 %, el tratamiento 1 (1:1) tuvo buena germinación en (Fig. 34 (a) y (c)) y los tratamientos 2 y 3 tuvieron muy poca germinación, incluso en el experimento 2 no germinó ninguna semilla (Fig. 34 (b)).

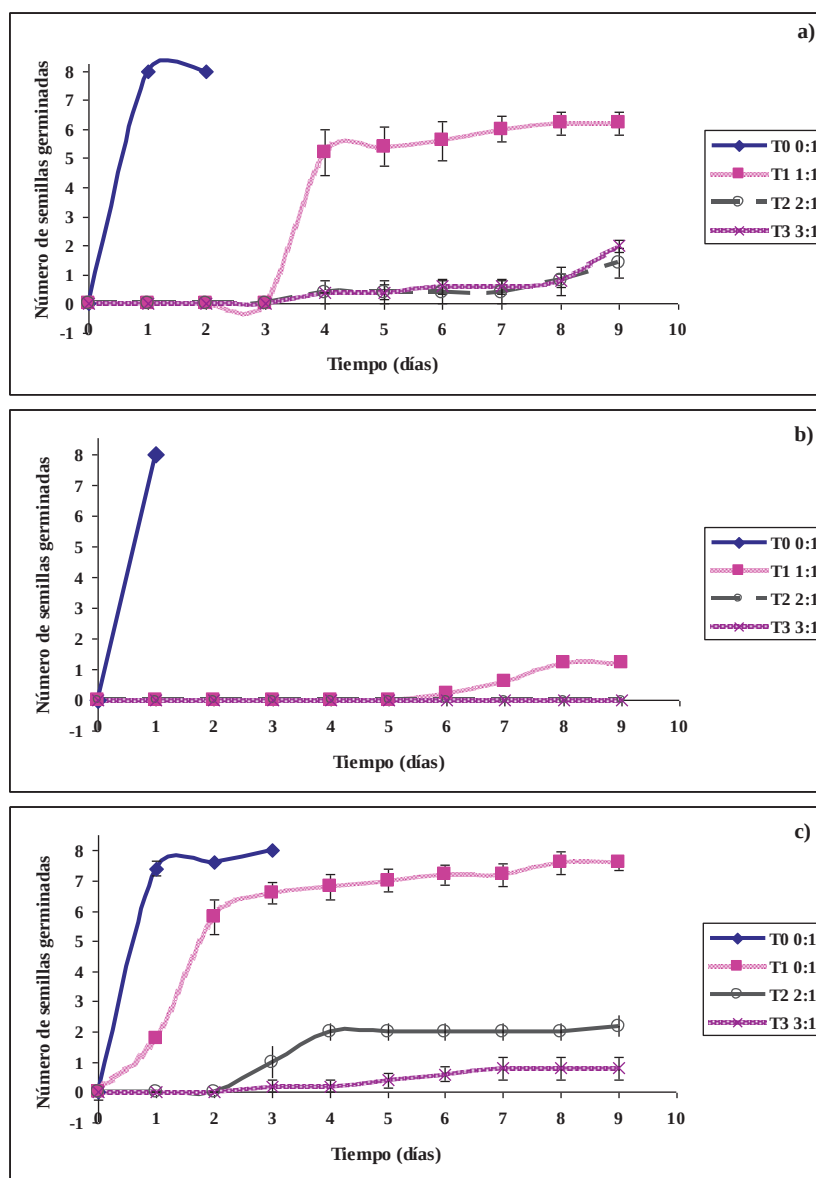


Figura 34 Tasas de germinación semillas de *L. sativa*. Las gráficas (a), (b) y (c) experimentos corresponden a los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente cultivadas a cuatro diluciones diferentes (T0 0:1, T1 1:1 T2 2:1 y T3 3:1) en agua de arrastre y aguas destilada.

b) Germinación y desarrollo de semillas

Radícula

Estos experimentos no cumplieron con las condiciones para ser analizadas en ANOVA, por lo que fueron analizados en Kruskal- Wallis, y se encontró que los experimentos resultaron ampliamente significativos $p = 0.000$. Se encontró mucha diferencia en el crecimiento de radícula entre el tratamiento control (C) con el resto (fig. 35) pues se observa que: $C \neq B \neq A$.

El desarrollo y la germinación de radículas de semillas *L. sativa*, fue inhibido 100 % al cultivar las semillas en diluciones 2:1 y 3:1 (A.Arr: A. dest) y 91 % a 1:1. La fracción hidrofílica del aceite esencial de *E. glabratum* inhibió la germinación y desarrollo de semillas de *L. sativa* (Fig. 35).

Hipocótilo

El crecimiento de hipocótilo (Fig. 35) se comporto casi idéntico a radícula: el valor de p es el mismo y hubo diferencias del tratamiento control respecto al tratamiento 1:1 y de este respecto a los de 2:1 y 3:1. También se concluye que los hipocótilos de las semillas de *L. sativa* son susceptibles a la fracción hidrofílica del aceite esencial en diluciones de concentración en medios de cultivo de 3:1-1:1 A.Arr:Agua destilada. La germinación de semillas se inhibe prácticamente un 100%.

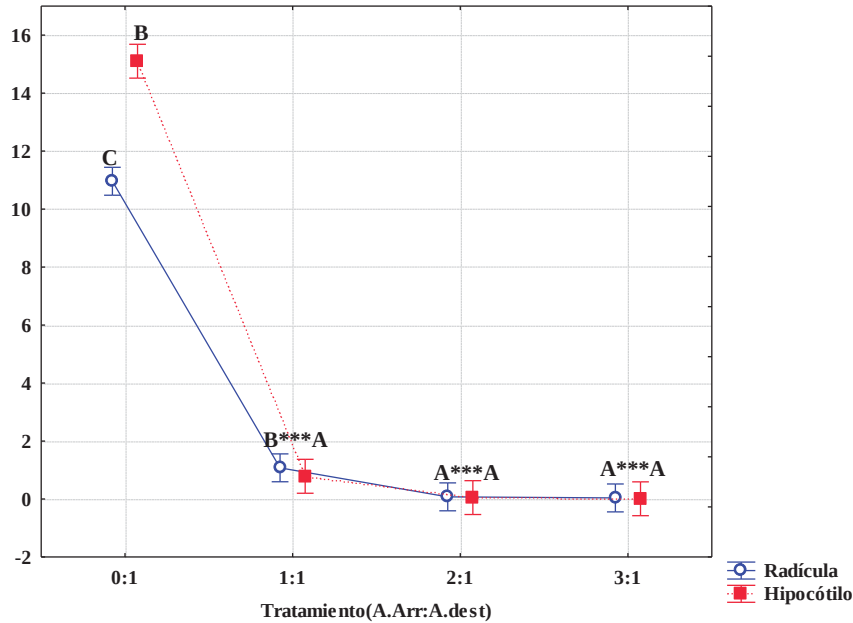


Figura 35. Experimentos 1, 2, y 3 promediados de germinación y desarrollo de radícula en semillas de *L. sativa* cultivadas a diferentes diluciones de A.Arr y agua destilada: 0:1(C), 1:1(B), 2:1,3:1(A).

c) Efectos sobre crecimiento temprano de semillas germinadas

Radícula

Los experimentos se tomaron como significativos dado que $p = 0.000$ (Fig. 36). El desarrollo de radícula en el tratamiento control fue muy diferente al resto. En los tratamientos 1:1, 2:1 y 3:1 (A.Arr: Agua dest) el crecimiento de las plántulas se detuvo al momento de ser resembradas a estos medios.

Las radículas de semillas de lechuga fueron inhibidas 100 % en las tres diluciones en que fueron probadas.

Hipocótilo

El valor de $p = 0.000$ resulto significativo para los experimentos de crecimiento de hipocotilo como se observa en la Fig. 36, donde se ve que $C \neq B \neq A$ y que conforme aumenta la dosis en los medios de cultivo, mayor es el efecto alelopático de la fracción

hidrofílica de *E. glabratum*. La inhibición del desarrollo del hipocótilo es del 70 %; a la dilución de 3:1, 65 % a 2:1 y 45 % a 1:1 sobre el hipocótilo de plántulas de *L. sativa*.

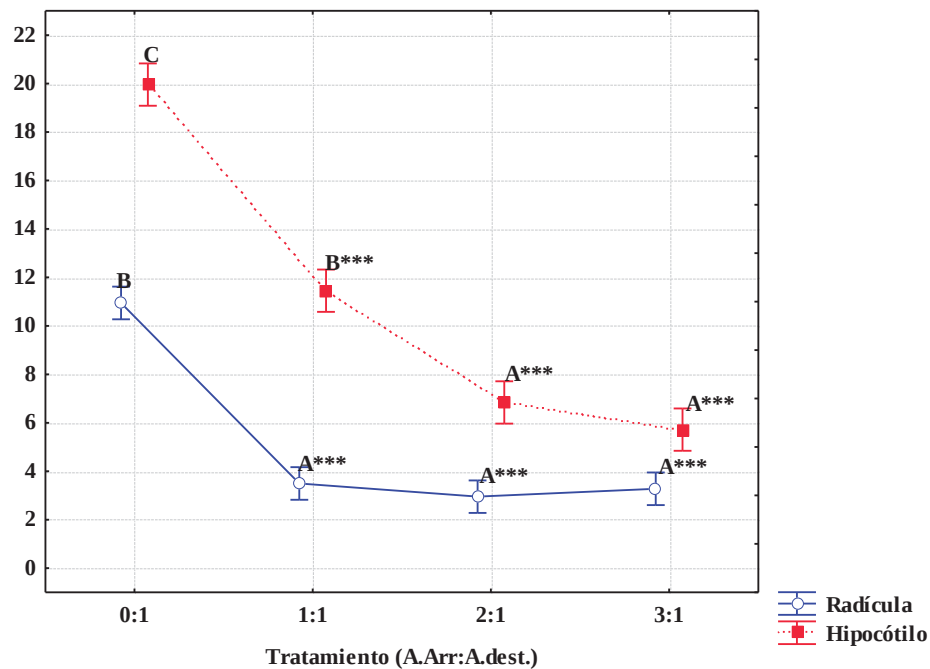


Figura 36. Experimentos 1, 2, y 3 promediados de crecimiento temprano de radícula e hipocótilo en plántulas de *L. sativa* cultivadas a diferentes diluciones de A.Arr y agua destilada: 0:1(B), 1:1, 2:1, 3:1(A).

El tratamiento control tuvo un crecimiento muy superior con respecto a las semillas germinadas y desarrolladas en las demás diluciones (3:1, 2:1 y 1:1 A.Arr:A. dest.) en todos los experimentos (Figs. 35-37). Sin embargo solo se observa que a la dilución 1:1 (Fig. 37) el crecimiento temprano de hipocótilos no es tan afectado, si alcanzan tamaños considerables pero no tan grandes como el tratamiento control.

7.2.2.2 Efecto de la fracción hidrofílica del aceite esencial sobre semillas y plántulas de *Pinus oocarpa*

a) Tasa de germinación

Las semillas germinaron en diferentes lapsos de tiempo, por lo mismo fueron observadas en tiempos distintos. No hubo mucha diferencia en los experimentos 1 y 2 (Fig. 37 (a) y (b)), solo en el tercero donde el tratamiento más concentrado tuvo baja germinación en comparación a los demás (Fig. 37 (c)).

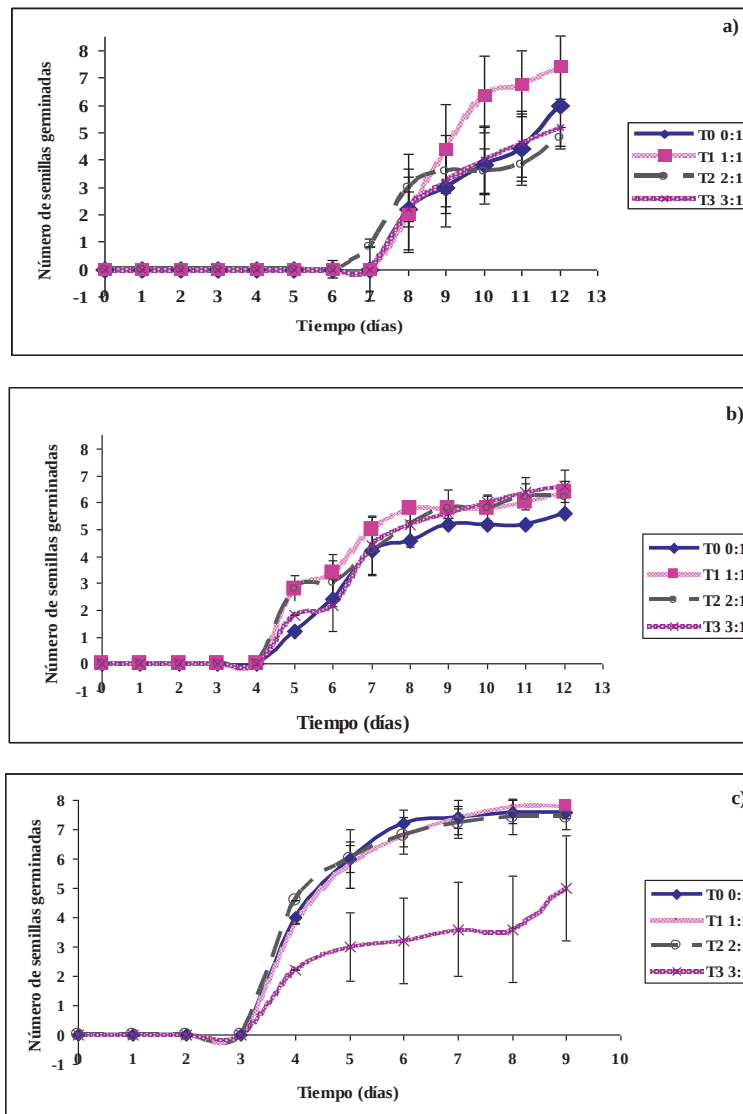


Figura 37. Tasas de germinación semillas de *P. oocarpa*. Las gráficas (a), (b) y (c) corresponden a los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente, cultivadas en cuatro diluciones diferentes T0 0:1, T1 1:1 T2 2:1 y T3 3:1 (A. Arr: agua destilada).

b) Germinación y desarrollo de semillas

Solo se gráfico uno de los experimentos en el cuál se observa que los tratamientos 0:1, 1:1 y 2:1, presentan tamaños similares en radícula e hipocótilo (Fig. 40 (d) y (e)). El tratamiento 3:1 tuvo menor crecimiento y sólo fue significativa la prueba en hipocótilo (Fig. 38 (e)).

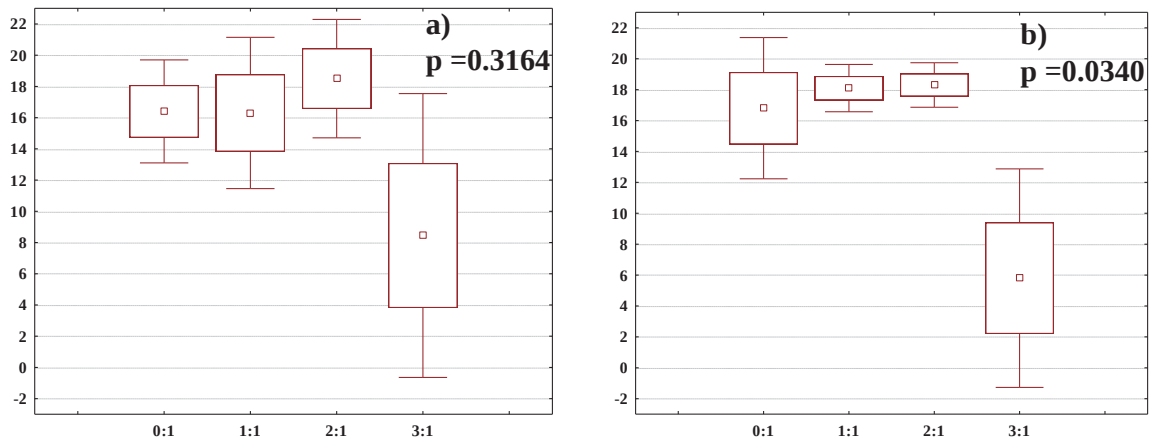


Figura 38. Graficas Kruskal-Wallis de germinación y desarrollo de radícula e hipocótilo de semillas de *P. oocarpa*, cultivadas en diferentes diluciones de A.Arr y agua destilada: (a) experimento 1 de radícula, (b) de hipocótilo.

c) Efectos sobre crecimiento temprano de semillas germinadas

Radícula

En este experimento solo se utilizaron 3 dosis: 0:1, 1:1 y 3:1 (A.Arr: Agua dest.) con cuatro semillas por caja.

Los valores de $p=0.000$ resultaron significativos, que los tratamientos son muy diferentes entre sí (Fig. 39) y que hay una dependencia del crecimiento respecto a la concentración de A. Arr. El desarrollo temprano de radícula de plántulas de *P. oocarpa* sufren un efecto alelopático del 56 % y 36 % al ser cultivadas en las diluciones 3:1 y 1:1 respectivamente.

Hipocótilo

En el caso de hipocótilo el valor de $p = 0.0144$ resulto significativo. Se observa gráficamente (Fig. 39) que $0:1=1:1 \neq 3:1$. El tratamiento 3:1 creció 10 y 15% menos respectivamente que los tratamientos 0:1 y 1:1. La fracción hidrofílica del aceite esencial ejerce un ligero efecto alelopático sobre el crecimiento temprano de hipocótilo de *P. oocarpa*.

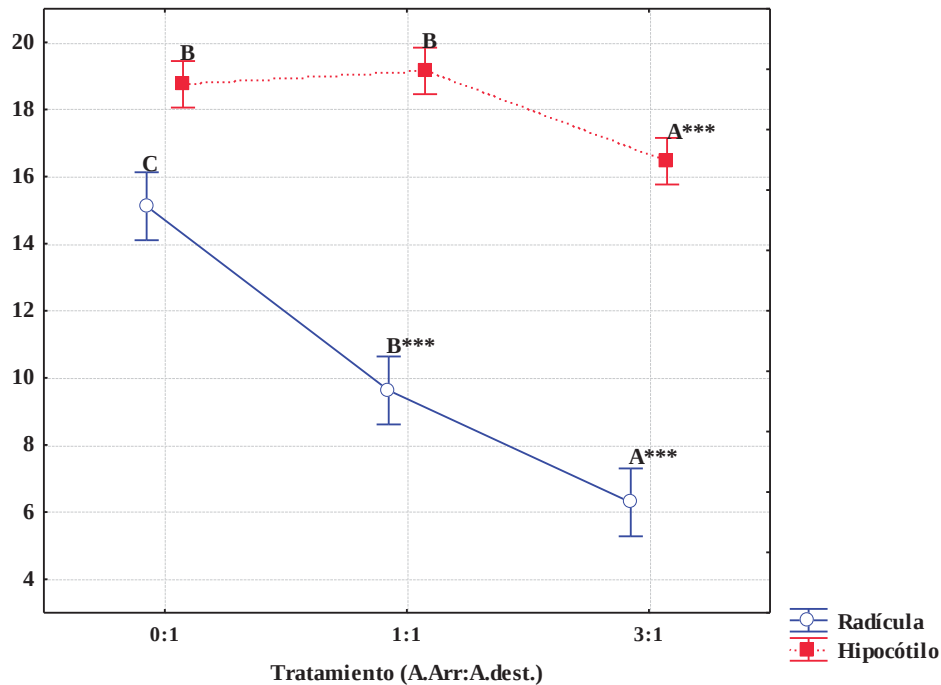


Figura 39. Experimentos 1, 2, y 3 promediados de crecimiento temprano de radícula e hipocótilo en plántulas de *P. oocarpa* cultivadas a diferentes diluciones de A.Arr y agua destilada: 0:1(B), 1:1, 2:1, 3:1(A).

7.2.2.3 Efecto de la fracción hidrofílica del aceite esencial sobre semillas y plántulas de *Lupinus elegans*

a) Tasa de germinación

Fue baja en los experimentos 1 y 2 (Fig. 40 (a) y (b)) y en el tercero alcanzo mejor germinación (Fig. 40 (c)). En las tres réplicas se observa, que los cuatro tratamientos germinan de forma similar, no siguen patrones, por ejemplo en la primera grafica la dilución 1:1 tuvo mejor germinación, que en el segundo 0:1, y el tercero 3:1.

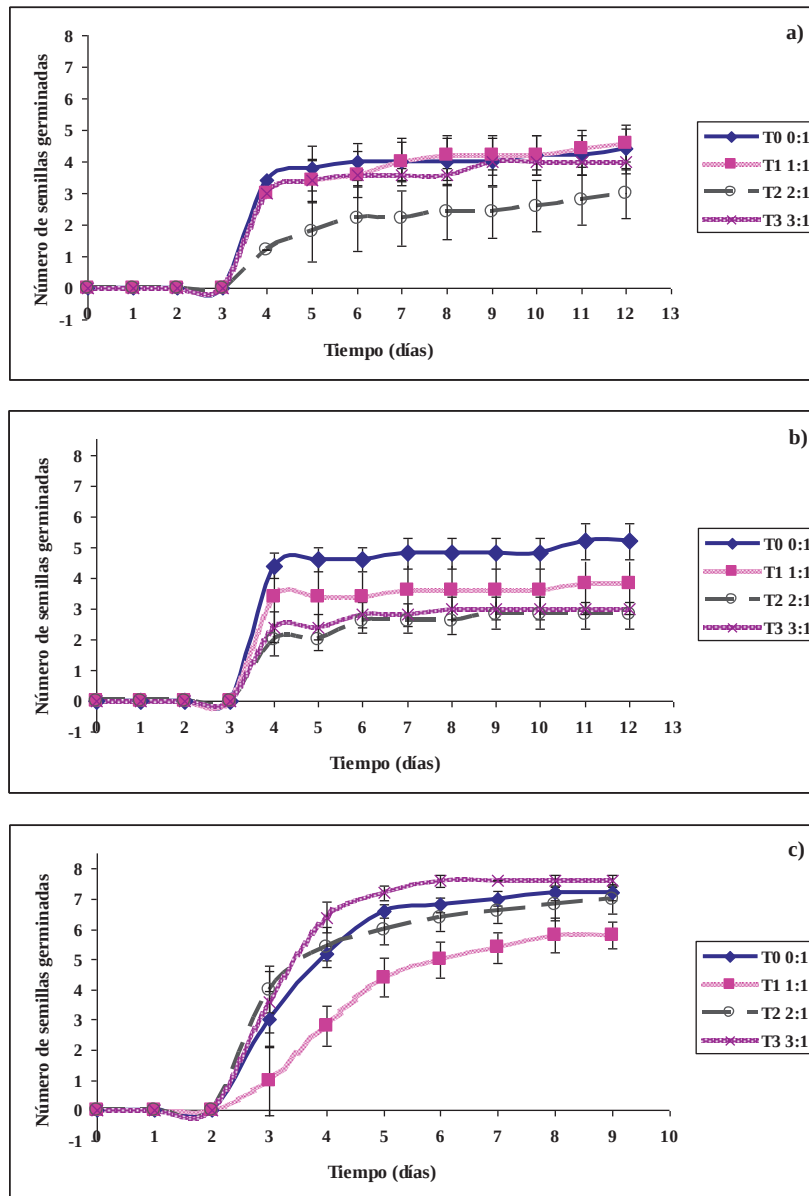


Figura 40. Tasas de germinación semillas de *L. elegans*. Las graficas (a), (b) y (c) corresponden a los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente, cultivadas a cuatro diluciones diferentes T0 0:1, T1 1:1 T2 2:1 y T3 3:1 (A. Arr: agua destilada)

b) Germinación y desarrollo de semillas

En este experimento el desarrollo de radícula e hipocótilo (Fig. 41 (a) y (b)) no fue afectado, los valores de p fueron muy elevados y los tamaños fueron similares en los cuatro tratamientos.

El comportamiento observado en las gráficas de tasa de germinación y de desarrollo y crecimiento de semillas de *L. elegans*, indican que la fracción hidrofílica del aceite esencial de *E. glabratum*, no presentan efectos alelopáticos sobre esta especie.

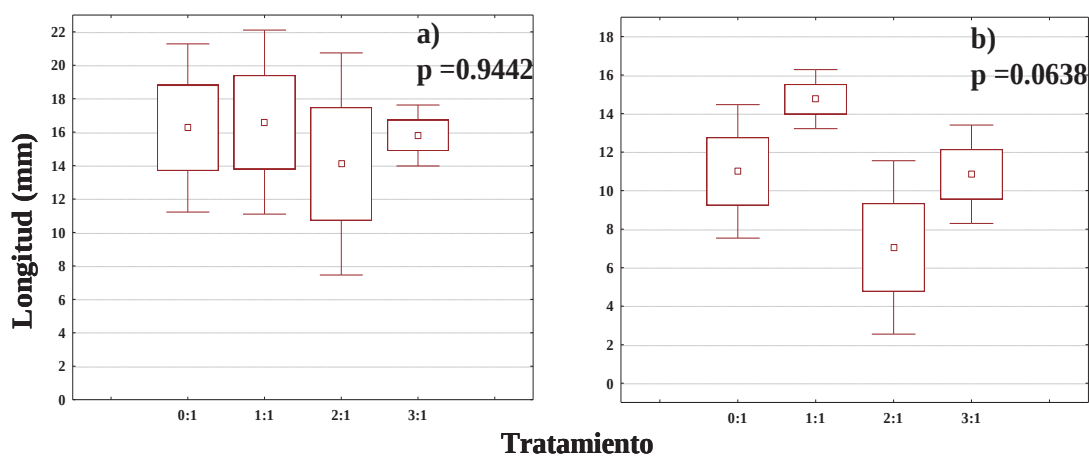


Figura 41. Gráficas Kruskal-Wallis de germinación y desarrollo de radícula e hipocótilo de semillas de *L. elegans* cultivadas en diferentes diluciones de A.Arr y agua destilada: (a) experimento 1 de radícula, (b) de hipocótilo.

VIII. DISCUSION

Composición química del aceite esencial de *Eupatorium glabratum*.

Esta es la primera vez que se reporta la composición química del aceite esencial de *E. glabratum*. Se obtuvieron 11 componentes puros (Cuadro 2) que no coinciden con los encontrados en otros aceites del género *Eupatorium*^(27,29,46,47). Algunos de los componentes se reportan por segunda vez en un aceite esencial de este género. También se obtuvieron compuestos no identificados de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica que posiblemente resulten una novedad para el género *Eupatorium*.

Los terpenos identificados no coinciden con los que se han reportado en otras especies del género *Eupatorium*; los monoterpenos característicos de este género que han sido aislados son principalmente derivados del timol (mono, di o tri oxidados) y sesquiterpenos derivados de *guaianes* (eupachinilidos y eupalinilidos) y de germacrenos, (eupakirunsis), componentes que no están presentes en *E. glabratum*.^(27, 46 y 47) La única especie reportada²⁵, que contiene la mayoría de compuestos encontrados en *E. glabratum*, pero en proporciones distintas es *Eupatorium cannabinum*, especie conocida por sus propiedades medicinales²⁹. La diferencia química podría deberse a la gran diversidad de especies pertenecientes al género *Eupatorium* y a su amplio rango de distribución.^(25,29, 46 y 47)

Otros compuestos descritos como aleloquímicos presentes en esta fracción son β -pineno^(6 y 35), *p*-cimeno y D-limoneno^(6 y 44).

La producción de aceite esencial de las hojas de *E. glabratum* en peso seco fue del 0.35 %, porcentaje bajo en comparación con otras plantas aromáticas como *Luarus nobilis* y *Origanum vulgare* que producen respectivamente 0.4-1.1 %³² y 5%¹⁴ de aceite esencial.

Sin embargo la presencia de volátiles emitidos por el cedazo es muy aparente, por el olor fuerte que se percibe fácilmente al acercarse a la planta aún sin perturbarla. Esto sugiere que los volátiles emitidos por la planta podrían tener un efecto alelopático sobre las semillas o plántulas de otras especies que estuvieran cerca del cedazo. Como se discute más adelante, los efectos de las fracciones del aceite esencial son claramente dependientes de la dosis, por lo que habría que medir en campo las emisiones para determinar si alcanzan concentraciones inhibitorias en condiciones naturales.

Todo esto va de acuerdo con la hipótesis de que el aceite esencial estudiado tiene propiedades alelopáticas, cosa que fue corroborada con los experimentos sobre la germinación y desarrollo temprano de lechuga, lupino y pino.

Potencial alelopático de la fracción hidrofóbica del aceite esencial

La germinación de semillas de las tres especies utilizadas, no fue muy afectada. Tomando en cuenta que los monoterpenos de *E. glabratum* son hidrocarbonatos los resultados son equiparables con los encontrados por Vokou y colaboradores (2003), cuyo trabajo mostro que los monoterpenos hidrocarbonatos, excepto (+)-3-carene, no afectan la germinación de semillas y plántulas de *L. sativa*, pero sí el desarrollo de las plántulas y que la mayoría de los terpenoides que contienen grupos alcohol, como los derivados del terpineol sobre todo terpinen-4-ol, y grupos cetona como pulegona son más agresivos tanto en la germinación y en el desarrollo de plántulas. En ese estudio también se reportan varios de los monoterpenos hidrocarbonados como α y β pineno, limoneno, p-cimeno, los cuales están presentes en los aceites esenciales de *E. glabratum* y ya habían sido reportados como alelopáticos en otros estudios, el efecto alelopático de estos monoterpenos pudo haberse ejercido de manera independiente o incluso pudo haber efecto sinérgico entre estos componentes como en el caso de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico que poseen un efecto inhibitorio sinérgico sobre la germinación y desarrollo de sorgo.

Así mismo en esa investigación se contrasta la germinación de semillas de *L. sativa* con la germinación de semillas de trigo,¹⁷ en las cuales se encontró que esta especie metaboliza algunos terpenoides puros con grupo cetona y aldehído como geranial y neral transformándolos a sus correspondientes alcoholes geraniol y nerol y pulegona transformada en mentofurano e isomentona. Se ha propuesto que los productos metabolizados resultan menos tóxicos que los originales y esta es una forma como algunas plantas inactivan los aleloquímicos¹⁷.

En esta investigación se obtuvo que el desarrollo y crecimiento de radícula fué inhibido para las tres especies a dosis de $1\mu\text{L mL}^{-1}$, inhibición que fue del 60 al 98%. Así mismo, el crecimiento temprano también fue afectado en las tres especies. Sin embargo los rangos de inhibición son dependientes de la dosis, siendo afectado el crecimiento a las cuatro concentraciones probadas $0.001\text{-}1\mu\text{L mL}^{-1}$.

Potencial alelopático de la fracción hidrofílica (A.Arr) del aceite esencial

De la fracción hidrofílica solo se obtuvieron cinco compuestos puros de los cuales el componente mayoritario no fue reconocido por la base de datos del cromatógrafo de gases, sin embargo si se identificaron tres compuestos: Ácido isobutírico, fenil metanol y α -terpineol.

Se sabe que el componente mayoritario tiene una fórmula molecular $C_{10}H_{18}O_2$, y tomando en cuenta que las fracciones de las otras colectas pueden ser ricas en 1-S α -pineno, este compuesto podría ser, 2,3 pinanodiol un producto de oxidación del doble enlace, además fue el espectro mas parecido al de la biblioteca NIST05, aun cuando la concordancia fue baja.

La composición química de las colectas realizadas en los meses de junio y julio fue diferente, ya que los componentes mayoritarios de la fracción hidrofílica eran 1-S y 1-R α pineno en proporciones de (14- 28 %). Esta fracción del aceite esencial resultó muy alelopática para la germinación, desarrollo y crecimiento temprano de semillas de *L. sativa*. Las tres diluciones que fueron probadas (1:1, 2:1 y 3:1 A.Arr: A. dest) afectaron la germinación de esta especie.

Los experimentos sobre *Lupinus elegans* y *Pinus oocarpa* no pudieron ser completados con la colecta de octubre de A.Arr con la que se realizaron los experimentos completos de *L. sativa*, esta colecta varió químicamente con respecto a las colectas posteriores, esta variación pudo haber ocurrido debido a la diferencia de las condiciones climatológicas, por ejemplo en octubre las temperaturas fueron bajas y las colectas de junio y julio, en época lluviosa contaron con una temperatura mas alta incluso se observo un mayor tamaño de la hoja de *E. glabratum*. También se pudo apreciar que el aroma del A.Arr correspondiente a la colecta octubre era mucho más fuerte que el de las otras colectas. Es posible que estas variaciones suprima el potencial alelopático de *E. glabratum*.

Lactuca sativa fue muy sensible a esta fracción ya que a la menor dosis a la que fue sometida presentó una fuerte reacción inhibitoria y aunque la mayoría de los componentes no fueron identificados, es sabido que *Lactuca sativa* posee efectos aleloquímicos en extractos hidrofílicos. Se ha reportado por ejemplo que en un de cultivar en Cheongchima, *Lactuca sativa* inhibió 100 % la germinación de semillas de alfalfa a dosis de 20 mg ml^{-1} .¹³ En otro estudio con fracciones hidrofílicas pero con otras especies, A.K. Hegazy A. K y Farrag H.F (2007), demostraron que los extractos

hidrofílicos de *Chenopodium ambrosioides* inhibieron *in vitro* la germinación y crecimiento tardío de semillas de *Lycopersicon esculentum*, *Beta bulgaris* var. *rapa*, *Melilotus indicus* y *Sonchus oleraceus* en rangos de dosis de 0.125-1 gr mL⁻¹.²⁶ Esto se debe a la naturaleza química de los componentes que son disueltos en solventes polares, como derivados de ácidos fenólicos descritos como aleloquímicos¹², tales como el fenol, fenil propanoides, cumarinas, quinonas, flavonoides, taninos, y otros fenoles miscelaneos^(12 y 35). También se reportan por Vokou y colaboradores (2003), que los monoterpenoides con grupo alcohol como α - terpineol tienen efectos alelopáticos en germinación y elongación de plántulas. Esto sugiere que la fracción hidrofílica analizada en este estudio, podría ser rica en terpenoides de este tipo, incluso terpenoides cetónicos y fenólicos, para cuya identificación se podría modificar el método utilizado en el cromatógrafo de gases o analizarlas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), además de intentar otros métodos de extracción para lograr una mejor identificación. También sería importante estudiar otros extractos con diferentes solventes orgánicos, de otros tejidos como semillas, tallo, y raíz para analizar si hay otros compuestos aleloquímicos que fueran liberados por otro mecanismo, como lixiviado de hojas y raíz, que pudieran operar simultáneamente con los componentes volátiles de las hojas de *E glabratum*.

La alelopatía es un fenómeno que no solo puede estudiarse por los efectos adversos y estragos que dejan en campos agrícolas y forestales, ya que es posible que los aleloquímicos permitan proveer estructuras básicas o plantillas para el desarrollo de nuevos herbicidas sintéticos ^{anaya} uso se ha sugerido que la incorporación de rasgos alelopáticos de plantas cultivadas o silvestres dentro de cultivos por métodos tradicionales o diseñados genéticamente podría también mejorar la biosíntesis y relación de aleloquímicos.

IX. CONCLUSIONES

Los componentes mayoritarios encontrados en la fracción hidrofóbica fueron 1-R- α pineno y α -felandreno. Sus proporciones varían dependiendo de la temporada de la colecta.

En la fracción hidrofílica con potencial alelopático el componente mayoritario de fórmula molecular $C_{10}H_{18}O_2$ no fue identificado; en las otras colectas que no resultaron alelopáticas 1-S- α pineno fue el componente mayoritario.

El aceite esencial de las hojas de *Eupatorium glabratum* posee componentes con potencial alelopático, ya que las fracciones del aceite inhibieron *in vitro* a la germinación y crecimiento temprano de *Lactuca sativa*, *Lupinus elegans* y *Pinus oocarpa* a dosis de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ tanto en radícula como en hipocótilo

Los resultados indican que la hipótesis de efectos alelopáticos del cedazo sobre lupinos y los pinos en los arenales debe de probarse en el campo para saber si este es un factor importante en el predominio del cedazo en los arenales de Llano de Parí.

X.BIBLIOGRAFÍA

1. Albuquerque R. M. J., Pires L. M., Pessoa L. D., Silveira E. R. (2006) Terpenoids, Flavonoids and other Constituents of *Eupatorium betonicaeforme* (Asteraceae) J. Braz. Chem. Soc., Vol. 17, No. 1, 68-72.
2. Alburquerque R. M.R., Silveira R. E., Uchôa de A. D., Lemos G. T., Souza E. B., Santiago P. G., Pessoa L. O. (2004) Chemical composition and larvicidal activity of the Essentials Oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C) Baker (Asteraceae) J. Agric. Food. Chem. 52: 6708-6711
3. Alejandro M. N., Lindig C. R., Sánchez R. C (2007). Response of *Pinus pseudostrobus* Lindl. to fertile growing medium and tephra-layer depth under greenhouse conditions. New Forests 34:25–30
4. Anaya A. L., Espinosa-García J. G., y Cruz Ortega R. (2001) Relaciones químicas entre organismos básicos y perspectivas de su aplicación. Editorial Plaza y Valdés 1:33-62, 4: 137-154
5. Anaya A. L., Espinosa-García J. G (2006) La química que entreteje a los seres vivos ciencias 83 4-13
6. Anaya Lang A. L. (2003) Ecología química. México D. F. Editorial Plaza y Valdés 2: 35-72, 10: 255-290
7. Bravo Monzón A. E. (2003) Emisión de volátiles en *Persea americana* Mill. Como respuesta al ataque del barrenador de la rama (*Copturus aguacatae* Kissinger), Tesis de licenciatura, Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Mich. México
- 8.- Brown T., Le May E., Bursten B.(1998) Química la Ciencia Central Séptima Edición Editorial Prentice Hall pp. 8-11

- 9.- Calderón de Rzedowski G., Rzedowski J. (2005) Flora Fanerogamica del valle de México. México D.F. Ed. Conabio.
- 10.- Callaway Ragan M., Deluca Thomas H., Belliveau Wendy (1999) Biological-control herbivores may increase competitive ability of the noxious weed *Centaurea maculosa*. Ecology, 80(4), 1999, pp. 1196–1201
- 11.- Castellan Gilbert W. Fisicoquímica Segunda edición (2002) Editorial Pearson Education pp. 325- 343
12. Croteau R., Kutchan T. M. Y Lewis N.G (2000) Natural Products (Secondary Metabolites) In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. 24:1250-1261
13. Chon S. U., Jang H.G., Kim D. K., Kim Y. M., Boo H. O., Kim Y. J. (2005) Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. Scientia Horticulturae 309–317.
- 14.- D'Antuono Filippo L., Galletti Guido C. y Bocchini Paola (2000) Variability of Essential Oil Content and Composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). Annals of Botany 86: 471-478.
- 15.- Dominguez Xorge. Química Orgánica (1992) Compañía Editorial Continental, S.A. de C. V. pp 536-37
16. Dongzhi Lin, Tsuzuki Eliji, Sugimoto Yasuhiro, Dong Yanjun, Matsuo Mitsuiro y Terao Hiroyuki (2004). Elementary identification of phenolic Allelochemicals from Dwarf Lilyturf plant (*Ophipogon japonicus* K) and their growth-inhibiting effects for two weeds in paddy rice field. Plant Prod Sci. 7(3): 260-265.
17. Dudai N., Larkov O., Mayer A. M., Poljakoff A., Putievsky E. y Lerner H. R (1999) Metabolism of Essential oils during inhibition of wheat seed Germination in: Black, K.

J. Bradford J. Vázquez- Ramos (2000) Seed biology advances and applications, CABI Publishing 30:315-320

18.- Espinosa- García F. J (1996) Revisión sobre la alelopatía de *Eucalyptus L'Herit* boletín de la sociedad botánica de México 58: 55-74.

19.- Espinosa García F. J. Martínez Hernández E., Quiroz Flores A. (2008). Allelopathic potencial of *Eucalyptus* spp plantations on germination and early growth of annual crops. Allelopathy journal 21 (1):25-38.

20.- Ewing Galen W. Instrumental methods of chemical analisis 3rd Edition Editorial Mc Graw-Hill

21.- Ferguson J.J. y Rathinasabapathi B. (2003). Allelopathy: How Plants Suppress Other Plants. [Biological Control of Weeds](#), University of Florida IFAS extention.

22.- García Zepeda E. A. (2000) Incidencia de alcaloides en poblaciones de *Datura stramonium* L. con patrones de vellosidad contrastante. Tesis de licenciatura Facultad de Químico farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia Mich. México.

23.- Gómez. R. M., Lindig C. R., Galindo V. S.,(2006) Effect of tephra depth on vegetation development in areas affected by volcanism. Plant Ecology 183:207 –213

24.- Grime Philip John (1982) Estrategias de adaptación de las plantas y procesos que controlan la vegetación 1era edición México D.F.: Editorial Limusa 5: 207-211

25.- He L., Hou J., Gan M., Shi J., Chantrapromma S., Fun H. K., Williams I. D., y Sung H. H. (2008) Cadinane Sesquiterpenes from the Leaves of *Eupatorium adenophorum* J. Nat. Prod., 71, 1485–1488

26.- Hegazy A. K. y Farrag H. F (2007) Allelopathic potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth and some cultivate and weed plants. J. Biotechnology & Biochemistry (2)1: 01-09

- 27.- Hendriks H., Malingre M. T., y Elema T. E. (1983) Pyrrolizidine alkaloids., flavonoids and volatile compounds in the genus *Eupatorium* Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition vol 5
- 28.- Frantisek Turecek/Mc Lafferty Fred W. Interpretation of mass spectra 4th Edition
- 29.- Judzientiene Asta (2007) Chemical Composition of Leaf and Inflorescence Essential Oils of *Eupatorium cannabinum* L. from Eastern Lithuania. J. Essent. Oil Res., 19, 403–406.
- 30.- Lindig Cisneros Roberto (2007). Unexpected Outcomes and Adaptative restoration in Michoacán, México: A Cautionary Tale from Sites with Complex Disturbance Histories. Ecological Restoration 25:4 263-266
31. Lindig C. R., Galindo V. S. y Lara C. S. (2006) vegetation of tephra deposits 50 years after the end of the eruption of the parícutín volcano, Mexico The southwestern naturalist 51(4):455–461.
- 32.- Marzouki H., Piras H., Bel Haj Salahc K., Medini H., Pivetta T., Bouzid S., Marongiu B. y Falconieri D. (2009) Essential oil composition and variability of *Laurus nobilis* L. growin in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs. Natural Product Research Vol. 23, No. 4, 343–354.
33. Morris C., Gross L. R. P. y Call A. C. (2009) Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls Plant Ecol 202:1–11
34. Morrison y Boyd Química Orgánica Quinta edición Editorial Pearson Education. Pp 559-620.
35. Nishida N., Tamotsu S., Nagata N., Saito Ch. y Saka A. (2005) Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and dna synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. Journal of Chemical Ecology, Vol. 31, No. 5 1187-1203.

36. Olenici N., Dduman M. L., Olenici V. (2007) Inhibitory effect of (-)-alpha-pinene high release rates on *Ips typographus* (L.) response to its aggregation pheromone. *Analele ICAS* 50:203-212.
- 37.- Reyes Castañeda Pedro. Bioestadística aplicada (1982) editorial Trillas México
- 38.- Rincón Hernández C. A (2005) Relación entre la diversidad química de las hojas del aguacatero criollo (*Persea americana* Mill. Var. *drymifolia*) y la incidencia del agallero de las hojas (*Trioza anceps* Tuthill) tesis de licenciatura Facultad de Químico farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Mich. México.
- 39.- Siegel S. (1979) Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta. 2da edición. Ed. Trillas
- 40.- Singh H.P., Batish R. Daizy., Kohli R. K. (2003) Allelopathic Interaction and Allelochemicals: New Possibilities for Sustainable Weed Management. *Critical Reviews in plant sciences*, 22(3&4):239-311.
- 41.- Singh H.P., Batish R. Daizy., Kohli R. K., Komal Arora, Shalinder Kaur. (2006) α -pinene Inhibits Growth and Induces Oxidative Stress in Roots. *Annals of Botany* 98: 1261–1269.
- 42.- Tiffany L Weir, Park S.W., Vivanco M. J. (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:472–479.
- 43.- Tiffany Weir L., Harsh Pal Bais, Vivanco Jorge M. (2003) intraspecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin, (-)-catechin, secreted by the roots of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 29, No. 11 2397-2412.

- 44.- Vokou D., Douvli P., Blionis G. J., Halley J.M. (2003) Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 29, No. 10, 2281- 2301.
- 45.- Yokotani T. K., Fujii Y., Hashimoto H., Yamashita M. (2003) Reduced allelopathic inhibition of Lettuce (*Lactuca sativa*) growth caused by velvet bean (*Mucuna pruriens*) under 3D-clinorotation. *Biological sciences in Space*. Vol. 17 No 1:14-17
- 46.- Zhang M. L., Wu M., Zhang J. J., Irwin D., Gu Y. Ch y Shi Q. W., Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium* *Chemistry & Biodiversity* – Vol. 5, 40-55
- 47.- Zhao X., Zheng G. W., Niu X. M., Li W. Q., Wang F. S., y Li S. H. (2009) Terpenes from *Eupatorium adenophorum* and Their allelopathic Effects on *Arabidopsis* Seeds Germination. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 478–482