

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Clemencia Gómez¹,
Ricardo Arango², Ligia Patricia Arévalo³,
Cecilia Delgado³, Marta Rocío Guzmán³
Sandra Milena León³, Diana Marentes³
Elia María Correa³ y Sandra Vargas³

Algunos estudios de alelopatía de *Rumex crispus* L. y *Polygonum segetum* HBK., en Colombia

ABSTRACT

Title: Some studies on allelopathy of *Rumex crispus* L. and *Polygonum segetum* HBK., in Colombia

Curly dock (*Rumex crispus*, 'lengua de vaca') and smartweed (*Polygonum segetum*, 'gualola'), are two common weed species that grow in subtropical areas of the world, where cause great losses in crops and grasslands due to their aggressiveness. In Colombia they are found on lands over 2000 m.o.s.l., and as they propagate by both, sexual and vegetative ways, it is very difficult to manage them. Several experiments were carried out in order to standardize the extraction methods, identify the extracts due to secondary metabolism from plants of *Rumex* and *Polygonum*, and evaluate the effects of such compounds over the germination and development of various species of plants. It was possible, through bioassays, to establish that watery extracts from the leaves and the roots contain allelopathic substances that increase the competitive ability of these weed species. On the other hand, qualitative analyses allowed identifying several allelopathic compounds like flavonoids. Initial bioassays were conducted over three groups of plants of *R. crispus* through experiments with ethanolic extracts and colored tests that confirmed the presence of flavonoids, terpenes, sesquiterpenolactones, quinones, alkaloids, glycosides and cumarines in plants of smartweed in those three growth states. Chalcones, aurones and flavonoles were detected as well as anthraquinone and terpenic glucosides, but not so, alkaloids. These results could become useful for advancing studies since they amplify the knowledge about allelopathic substances of these weed species, and show their potential use in managing plant-weed relation programs.

Key Words: Allelopathy, secondary metabolism, flavonoids, terpenes, sesquiterpenes, cell suspension.

1. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas, CORPOICA, Apartado Aéreo 240142, Las Palmas, Bogotá. e-mail: cgomez@corpoica.org.co. Fax 051+ 4227373.

2. Biólogo, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Bogotá.

3. Licenciadas en Biología y Química, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.

RESUMEN

La lengua de vaca (*Rumex crispus* L.) y la gualola (*Polygonum segetum* HBK.), son especies de malezas comunes que crecen en las áreas subtropicales del mundo donde ocasionan grandes pérdidas en cosechas y praderas debido a su agresividad. En Colombia se encuentran en zonas ubicadas por encima de los 2000 msnm, y son muy difíciles de manejar por su alta competitividad y gran habilidad para propagarse, tanto sexual como vegetativamente; a menudo crecen solas en un campo gracias a su capacidad para prevalecer sobre otras especies de plantas. Con el fin de estandarizar una metodología para la extracción e identificación de algunas sustancias provenientes del metabolismo secundario de las dos especies citadas, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de tales compuestos sobre la germinación y desarrollo de especies agrícolas. A través de bioensayos se estableció que los extractos acuosos de hojas y raíces contenían varias sustancias alelopáticas: flavonoides, 5-deoxiflavonas, 7-8-dihidroflavononas y ácidos ferúlico, caféico y sinápico. Los extractos etanólicos de plántulas de *Rumex crispus*, en tres estados de crecimiento, permitieron confirmar la presencia de flavonoides, terpenos, sesquiterpenolactonas, quinonas, glicósidos y cumarinas, pero no de alcaloides. Por otra parte, mediante la utilización de células de *Rumex crispus* en suspensión, se logró aumentar la producción de flavonoides. El conocimiento de la eficacia de las sustancias alelopáticas de estas especies y su uso potencial puede llegar a ser de gran utilidad en programas de manejo de las relaciones planta-planta.

Palabras claves: Alelopatía, metabolismo secundario, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, células en suspensión.

INTRODUCCIÓN

EN LAS COMUNIDADES VEGETALES algunas especies regulan a otras produciendo o liberando repelentes, atrayentes, estimulantes o inhibidores químicos, fenómeno que se ha clasificado dentro del concepto de 'ecología química'. En este amplio espectro, la alelopatía se ocupa de las relaciones planta-planta y planta-microorganismo (Rice, 1984). El estudio de este grupo de compuestos se inició cuando la química orgánica descubrió su valor como medicamentos, venenos, saborizantes de alimentos y materias primas para la industria. (Putnam y Cung, 1986). Así, en diferentes especies de plantas se producen diferentes metabolitos secundarios, aunque es frecuente encontrar en una misma planta diversas mezclas de estas sustancias. Estas combinaciones varían en su composición y abundancia en las diversas células, teji-

dos y órganos de la planta, y se modifican con la edad de los mismos y con las condiciones ambientales (Anaya, 1989; Olofsdotter, 2001).

El efecto de la interferencia entre especies no sólo se debe a una interacción competitiva, sino además, a la presencia de inhibidores. En los agroecosistemas, la colonización o distribución de las especies indeseables obedece en muchos casos a un proceso químico que ocurre de manera amplia en comunidades naturales y, en parte, es responsable de la distribución o densidad de muchas especies (Risvi y Risvi, 1992). Estudios previos realizados con *Rumex crispus* y *Polygonum segetum* indican que dichas especies tienen propiedades alelopáticas que inhiben o estimulan el crecimiento de una planta mediante la producción de sustancias químicas (Putnam y Cung,

1986). De otra parte, los productos de origen vegetal poseen un amplio potencial de uso como plaguicidas, en algunos casos son muy específicos como ocurre con el ajeno y con *Tagetes patula*. Las propiedades alelopáticas de una especie pueden ser manipuladas en el laboratorio, utilizando el cultivo *in vitro*, merced al aumento en la cantidad de los metabolitos secundarios responsables de la aleopatía (Ahmed *et al.*, 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior, los objetivos principales de los experimentos realizados se centraron en determinar por medio de bioensayos si *Rumex crispus* y *Polygonum segetum* presentan propiedades alelopáticas y si sus principios alelopáticos ejercen efecto sobre el crecimiento de especies cultivables; así mismo, identificar algunas de las sustancias con potencial alelopático procedentes del metabolismo secundario de las especies *R. crispus*, y *P. segetum* en tres estados de su crecimiento, y cultivar callos y células en suspensión de *R. crispus* para aumentar la producción de metabolitos secundarios.

Materiales y métodos

Determinación de la actividad alelopática de *Rumex crispus* y *Polygonum segetum*

Los extractos se obtuvieron de plantas de *R. crispus* y *P. segetum* colectadas en estado adulto de los campos del Centro de Investigación Tibaitatá de CORPOICA, ubicado en el Municipio de Mosquera, Cundinamarca (Colombia), a una altura de 2.643 msnm, con 12,9°C de temperatura promedio, humedad relativa de 78% y precipitación 649,8 mm.

Las partes de las plantas, hojas y tallos se colocaron en un agitador Eberbach® durante ocho horas y se filtraron, el pH se ajustó a 6.0 de acuerdo con la metodología de Einhelling y Rasmussen (1973). Con el fin de evitar el efecto de la presión osmótica sobre la germinación, se realizó un ensayo de tolerancia a dicha presión en experimentos de germinación empleando como indicador el manitol. Se utilizaron semillas de trigo, arveja, rábano, coliflor, repollo, pepino, fríjol y remolacha como indicadoras, material que fue utilizado luego en nueve experimentos.

Por su parte, los bioensayos de germinación y crecimiento se realizaron bajo condiciones controladas, utilizando un germinador Conviron® con 12 horas de luz y 12 de oscuridad, 17°C de temperatura y una humedad de 70%, durante cinco días, al cabo de los cuales se midió la

germinación, y posteriormente, la longitud del tallo y de la raíz; utilizando para el proceso un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Para determinar la naturaleza química de las sustancias presentes se emplearon fracciones de etanol, acetona y éter de petróleo a partir de las hojas y raíces de lengua de vaca y gualola (Ahmed *et al.*, 1990), y se extrajeron 50 gramos de material fresco con 500 ml de etanol al 70%. A 100 ml del extracto se añadieron 100 ml de acetona, la mezcla se agitó fuertemente y se dejó 10 minutos en reposo para que ocurriera la separación de las dos fracciones. La fracción acetónica se mezcló luego con 100 ml de éter de petróleo y se repitió el procedimiento anterior.

Estas fracciones fueron aplicadas sobre papel de filtro, y una vez evaporados los solventes, se hicieron pruebas de germinación, crecimiento y velocidad de germinación; posteriormente se realizaron las pruebas de Dragendorff y Mayor para alcaloides, espuma para saponinas, cloruro férrico y Shinoda para flavonoides, antrona para glicósidos y Lieberman-Buchard, Salkowski e hidroxamato férrico para terpenos y esteroides (Harborne, 1984). Finalmente, se realizaron pruebas de cromatografía ascendente y bidimensional en papel para separar e identificar los compuestos presentes en los extractos acuosos.

Identificación de algunas sustancias alelopáticas en tres estados de crecimiento de *R. crispus*

Para el efecto, se extrajeron los aleloquímicos de 1.000 gramos de plantas de *Rumex crispus* en tres estados de crecimiento: plantas pequeñas (10-15 cm de altura), medianas (20-25 cm de altura), y adultas (30-50 cm de altura, en floración), con etanol al 70%. Como indicadoras de los bioensayos se utilizaron semillas de rábano; simultáneamente se pesaron 100 gramos de material vegetal fresco, se diluyeron con 100 ml de etanol al 70% y se agitaron durante ocho horas, luego se filtraron y concentraron en un liofilizador. También se hicieron pruebas de germinación y crecimiento siguiendo la misma metodología descrita en el primer experimento.

Con el fin de identificar el grupo de compuestos al que pertenecían las sustancias que causaban el efecto sobre las plantas, se realizaron reacciones coloridas para detectar alcaloides, cumarinas, flavonoides, glicósidos, quinonas, sesqui-

terpenlactonas, lactonas y terpenos. Una vez identificados los grupos a los que pertenecían los aleloquímicos, se procedió al fraccionamiento del extracto etanólico, usando como solventes bencina de petróleo y acetato de etilo. Las fracciones resultantes fueron sometidas a cromatografía de capa delgada, utilizando como reveladores cloruro de cobalto, amoníaco, hidróxido de potasio, pentacloruro de antimonio, luz ultravioleta y vapores de yodo. De otra parte, para lograr la separación y purificación de los compuestos, se empleó la cromatografía preparativa. Cada una de las fracciones se concentró en un rotavapor y se dejó evaporar el solvente. Sobre estas fracciones se realizaron bioensayos de germinación y crecimiento, empleando la metodología ya mencionada.

Identificación de algunas sustancias aleloquímicas en tres estados de crecimiento de *P. segetum*

Se utilizaron 800 gramos de plantas de *P. segetum*, en tres estados de crecimiento correspondientes a plantas pequeñas, con cuatro y hasta 12 hojas, plantas medianas con 15 a 25 hojas y plantas adultas con más de 30 hojas en estado de floración. Se obtuvieron extractos etanólicos macerando el material fresco con nitrógeno líquido, agitado durante ocho horas y luego liofilizado. Se realizaron pruebas coloridas tradicionales para flavonoides, esteroides, sesquiterpenlactonas, quinonas, alcaloides, saponinas, cumarinas, taninos y glicósidos. Con los mismos extractos se realizaron bioensayos de germinación, crecimiento y desarrollo, utilizando como indicadoras *Rumex crispus* y rábano. Las condiciones de los bioensayos fueron las mismas mencionada en los experimentos anteriores.

La identificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía de columna (CC), con diámetro de 2,9 y 50 cm de largo, y una fase estacionaria de sílica gel G de 60 a 200 mesh específica para CC. A fin de empacar las columnas con los diferentes extractos, se inició con el solvente de más baja polaridad, de acuerdo con la escala eulotrópica, con los solventes bencina, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, agua y ácido acético glacial, y de capa delgada. A su vez, con el fin de identificar cualitativamente los compuestos con potencial alelopático, se utilizaron placas con dimensiones de 5 cm x 12 cm y 6 cm x 15 cm, cubiertas con sílica gel tipo H60; mediante reveladores no

destruictivos y destructivos, se observó una gran variedad de colores que permitieron hacer una aproximación a los posibles compuestos de la planta, y con el uso de solventes diferentes y otros reveladores, se identificó el grupo al que pertenecían las sustancias aleloquímicas de *P. segetum*.

Cultivo de callos y células en suspensión de *R. crispus* para aumentar la producción de metabolitos secundarios

Para este proceso se emplearon fracciones de tallos, hojas y raíces provenientes de plántulas de cinco centímetros, obtenidas por propagación sexual de *R. crispus*. Las fracciones de órganos se sembraron en medio semisólido con las hormonas estimuladoras de la producción de callos, ácido naftalen-acético (ANA) a una concentración de 2 miligramos por litro y kinetina (4 mg l^{-1}), (Flores y Medina, 1995). Todo el material se mantuvo en el cuarto de crecimiento a 26°C, con un fotoperíodo de 24 horas luz y humedad relativa de 50 a 55%. A los cuatro meses se obtuvo una gran producción de callos y, ante el inicio de la fotosíntesis –con el fin de obtener proliferación de células–, dicha producción se pasó a un medio semisólido con ácido indol acético y 6-benzil-aminopurina. A medida que proliferaban los callos en el medio, se cambiaron a un medio líquido con ANA y kinetina, agitándolos durante 24 horas con el objeto de que las células embriogénicas en suspensión se fueran desprendiendo del callo; cada dos semanas se cambió el medio. Así, se obtuvieron dos muestras: las células embriogénicas y el callo que sirvió para la producción de nuevas células. El medio utilizado para la producción de células embriogénicas fue el mismo empleado para las pruebas coloridas sobre las cuales se realizó la identificación de los metabolitos secundarios mediante las siguientes pruebas: amoníaco, Shinoda, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico para la detección de los flavonoides; para identificar las quinonas se utilizó el hidrosulfito sódico y la reacción de Bortrager, y para los terpenos se usó anhídrido acético (Lieberman-Burchard y Salkowski). Las células en suspensión se mantuvieron constantemente en agitación y luego, fue el material utilizado para la regeneración de las plantas, las cuales se colocaron en medio semisólido sin fitohormonas en el cuarto de crecimiento.

Para la producción de callos se utilizó un diseño completamente al azar con tres

repeticiones. En las pruebas coloridas se utilizaron cuatro repeticiones; para el análisis estadístico se usó una prueba de varianza. Los trabajos se llevaron a cabo en los Laboratorios del Programa Nacional de Ecofisiología Vegetal y de Biotecnología Agrícola del Centro de Investigaciones Tibaitatá, de CORPOICA, y en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Javeriana de Bogotá.

Resultados y conclusiones

Determinación de la actividad aleopática de *Rumex crispus* y *Polygonum segetum*

Los extractos de hojas y raíces *Rumex crispus* y *Polygonum segetum* en una

concentración de 0.05% ocasionaron un efecto inhibitorio sobre la germinación del trigo, la coliflor y la arveja, efecto medido según la prueba de Duncan a nivel de 0.05%. La germinación del repollo no se inhibió significativamente por los extractos de hojas y raíces de *Polygonum* (Tablas 1 y 2). Así mismo, la velocidad de germinación en todas las especies se vio reducida significativamente por los extractos de hojas y raíces de *Rumex crispus* al 0.1%, afectando principalmente al trigo y en menor proporción al fríjol.

Por otra parte, la velocidad de germinación en todas las especies se redujo en los extractos de hojas y raíces de *Rumex*

Tabla 1. Efecto de los extractos acuosos sobre la germinación, representado como porcentaje de inhibición de las especies indicadoras

Especie indicadora	Control	Rumex crispus				Polygonum segetum			
		Hojas %		Raíz %		Hojas %		Raíz %	
		0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05
Trigo	0e*	68.1 a	40.6 c	68.2 a	33.2 cd	56.3 b	28.7 d	57.2 b	24.7 d
Arveja	0d	40.8 a	22.2 b	38.0 a	21.5 b	33.0 a	10.7 c	33.4 a	11.4 c
Rábano	0b	53.5 a	3.0 b	58.0 a	3.0 b	49.0 a	1.0 b	52.3 a	1.0 b
Repollo	0d	55.2 a	20.0 c	55.0 a	17.8 c	45.2 b	2.2 d	45.5 b	1.2 d
Coliflor	0c	57.0 a	28.6 b	54.3 a	27.9 b	46.2 a	17.6 b	49.3 a	19.9 b
Pepino	0e	55.0 a	10 de	42.1 ab	3.0 e	34.0 bc	3.0 e	23.0 cd	1.0 e
Fríjol	0c	26.0 a	4.5 c	21.5 ab	7.5 c	17.5 b	2.5 c	18.0 ab	1.5 c
Remolacha	0b	28.9 a	-1.2 b	26.5 ab	-1.2 b	24.9 a	-4.4 b	23.8 a	-3.4 b

*Los valores acompañados con diferente letra dentro de la misma especie difieren al 0.05 % según la prueba de Duncan.

Tabla 2. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de la germinación de las especies indicadoras

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	C.V.
Trigo	8	16491.055	2061.381	59.71	14.019
Arveja	8	6267.512	783.439	25.27	23.714
Rábano	8	22790.603	2848.825	175.92	3.661
Repollo	8	17516.222	2189.527	114.85	16.155
Coliflor	8	12063.587	1507.948	29.35	21.43
Pepino	8	6688.000	836.000	22.26	32.524
Fríjol	8	1529.000	191.125	16.08	31.345
Remolacha	8	3564.461	445.557	7.49	73.995

Tabla 3. Efecto de los extractos acuosos sobre la velocidad de germinación y diferencias respecto del control con las especies indicadoras

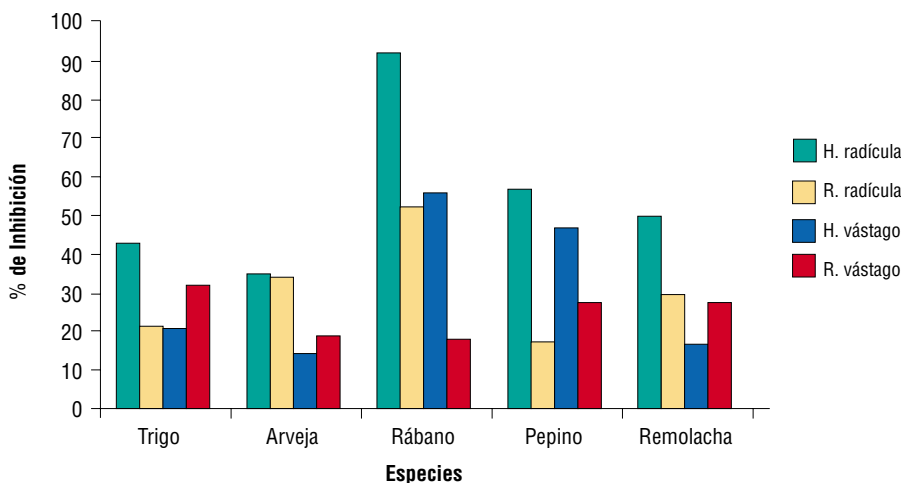
Especie indicadora	Control	Rumex crispus				Polygonum segetum			
		Hojas %		Raíz %		Hojas %		Raíz %	
		0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05
Trigo**	0a*	70.5f	41.0d	71.2f	33.3cd	59.4e	29.4bc	60.5e	24.4b
Arveja**	0a	43.3d	23.7c	39.6d	23.4c	34.4d	11.7b	34.5d	12.9b
Rábano**	0a	57.0c	11.2b	57.1c	11.4b	53.1c	7ab	56.4c	5.7b
Repollo**	0a	62.3e	26.2c	58.8e	25.5c	49.2d	9.9b	46 ad	5.9ab
Coliflor**	0a	65.3e	33.2c	58.5de	32.1bc	53.0d	23.3b	54.0d	24.7bc
Pepino***	0a	63.2f	19.9c	53.7ef	11.5bc	47.0de	13.2bc	38.7d	8.6ab
Fríjol***	0a	33.6c	11.0ab	28.1c	12 ab	24.2c	6.7ab	24.2c	6.1ab
Remolacha***	0a	34.3b	4.2a	30.5b	4.9a	29.7b	0.8a	31.5b	2.0a

*Los valores acompañados con diferente letra dentro de la misma especie difieren al 0.05 % según la prueba de Duncan.

** Promedio de 400 semillas. *** Promedio de 200 semillas.

Tabla 4. Análisis de varianza para el índice de velocidad de la germinación de las especies indicadoras

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	C.V.
Trigo	8	2245066.222	280633	79.50	9.052
Arveja	8	1052764.000	131595.5	22.59	8.314
Rábano	8	2810332.000	351291.5	198.17	5.179
Repollo	8	1610537.555	201317.194	105.80	6.689
Coliflor	8	1271830.888	158978.861	47.98	9.846
Pepino	8	385956	48244.5	53.45	6.1234
Fríjol	8	368671.111	46083.888	16.87	4.737
Remolacha	8	1214476.000	151809.5	12.12	7.424

**Figura 1.** Efecto de los extractos de hoja (H) y raíz (R) de *Rumex* sobre el crecimiento de la radícula y el vástago de varias especies indicadoras.

al 0.1%. Los extractos de *Polygonum* no afectaron significativamente la velocidad de germinación (Tablas 3 y 4).

Los ensayos de crecimiento para trigo, arveja, rábano, pepino y remolacha en las tres concentraciones de los extractos acuosos de hojas de *Polygonum* demostraron actividad inhibitoria para la longitud de la radícula. Todos los extractos al 0.05% inhibieron significativamente el crecimiento del vástago en las especies indicadoras; así mismo, se encontraron

diferencias altamente significativas entre tratamientos para las especies indicadoras utilizadas, con excepción de los extractos de hojas y raíz de *Polygonum* al 0.01% y 0.03% sobre trigo, y en arveja los extractos de *Rumex* y la raíz de *Polygonum*, en concentración del 0.01% (Figura 1).

Las pruebas químicas cualitativas dieron como resultado la presencia de varios compuestos flavonoides y glicósidos y, en especial, compuestos fenólicos que

fueron las sustancias detectadas con mayor frecuencia.

Los resultados biológicos obtenidos demostraron que las hojas de *Rumex* y *Polygonum* poseen sustancias alelopáticas que pueden inhibir hasta 75% la germinación y hasta 90% el crecimiento. Los parámetros más sensibles fueron la elongación de la radícula en el rábano y el porcentaje de germinación en el trigo.

La inhibición en la germinación y el crecimiento de las especies indicadoras permitió corroborar que *Rumex crispus*, y *Polygonum segetum*, son especies liberadoras de sustancias alelopáticas que, bajo la forma de compuestos fenólicos, afectan la emergencia de las especies adyacentes; así mismo, que la inhibición puede ser causada por los ácidos ferúlico, caféico, sinápico o para-cumárico como lo han sugerido varios autores (Rice, 1984; Putnam y Cung, 1986). Los resultados de las cromatografías coinciden con lo obtenido por Datta y Chatterjee (1978), en lo relacionado con la naturaleza de los compuestos fenólicos encontrados en otras especies de *Polygonum*.

Identificación de algunas sustancias alelopáticas en *R. crispus* en tres estados de crecimiento

La germinación del rábano, utilizado como planta indicadora, no se afectó por el extracto etanólico de lengua de vaca (*R. crispus*). Respecto del crecimiento del tallo, se ocasionó estimulación cuando se utilizaron extractos provenientes de los tallos de las plantas en el primero y segundo estados de crecimiento. El crecimiento de la raíz sufrió inhibición cuando las plántulas crecieron en extractos de *R. crispus* en el primer estado de crecimiento y de tallo en el tercer estado. En cuanto al peso fresco de las plántulas, éste se vio inhibido con extractos de hojas del primer estado de crecimiento, mientras que se vio estimulado con extractos de tallo en los dos primeros estados de crecimiento. Estos resultados indican que las sustancias extraídas con etanol tienen efecto sobre el crecimiento y no sobre la germinación (Tabla 5).

Los resultados de las pruebas coloridas mostraron que los grupos de sustancias más frecuentes en los extractos etanólicos son: flavonoides, terpenos, sesquiterpenlactonas, quinonas, glicósidos y cumarinas.

En la fracción éter de las pruebas cromatográficas se encontraron flavonoides, terpenos, chalconas y auronas, flavonas, quinonas y glucósidos de antraquinonas.

Tabla 5. Efecto de los extractos etanólicos de *R. crispus* sobre el crecimiento de plántulas de rábano

Estado	Longitud del tallo			Longitud de la raíz			Peso fresco		
	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja
A (10-15 cm)	39.04	59.08**	37.62	97.05	88.53	50.01**	2.97	5.31	1.83**
B (20-25 cm)	42.42	58.87**	46.66	63.6	81.9	69.51	3.71	4.76	4.34
C (> 30 cm)	31.02	33.02	30.84	57.51	53.68**	104.32	2.89	3.49	2.55
Control	36.34	36.34	36.34	90.27	90.27	90.27	3.73	4.02	4.40

** Diferencias significativas 0.01% según la prueba de comparación de Tukey.

Por su parte, en la fracción acetato de etilo se encontraron flavonoides, terpenos, chalconas y auronas, flavonoides y quinonas; finalmente, en la fracción cloroformo se presentaron flavonoides, quinonas y antraquinonas. Estos mismos grupos no afectaron la germinación de las semillas de rábano, pero el crecimiento sí se afectó por los grupos presentes en la fracción de acetato.

Los resultados obtenidos en los tres estados de crecimiento indican que los compuestos activos presentes pertenecen a los grupos de flavonoides, terpenos y quinonas. Sin embargo, la fracción de benzina de petróleo extrae compuestos que se comportan de una manera estimuladora, mientras que los obtenidos con acetato de etilo y cloroformo, se comportan de manera inhibitoria y se presentan en mayor cantidad en la fracción cloroformo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios investigadores (Ahmed, 1990; Datta y Chatterjee, 1978) quienes encontraron sustancias pertenecientes al grupo de los flavonoides en *Rumex spp.* y *Polygonum spp.*, que en algunos casos han sido señaladas como agentes causantes de envenenamiento del ganado. En 1984, Rice aisló cuatro inhibidores de plantas de *Polygonum aviculare*, tres de las cuales fueron glicósidos. También se encontraron en *Rumex spp.* glicósidos de antraquinona; las partes aéreas demostraron la presencia de emodín en forma libre o como glicósido, mientras que crisofanol sólo se detectó en una sola muestra.

Identificación de algunas sustancias aleloquímicas en *Polygonum segetum* en tres estados de crecimiento

En las pruebas coloridas de los extractos etanólicos de *P. segetum* se obtuvieron indicios de la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, los cuales correspondían en su mayoría, durante los tres estados de crecimiento, a flavonoides, cumarinas y glicósidos, confirmando así lo encontrado por Arango en 1997; además, se encontraron otros compuestos como saponinas, terpenos y alcaloides, y en menor proporción, quinonas y sesquiterpenlactonas. Algunos extractos, como los correspondientes a las hojas y a las raíces del primer estado, hoja y tallo del tercer estado y raíz del segundo, al ser disueltos en agua formaron espuma estable debido a la presencia de saponinas, que son un grupo de glicósidos solubles en agua. Las quinonas se encontraron en hojas, tallos y raíces. La presen-

cia de estas sustancias evidencia la alelopatía y refuerza la hipótesis de varios autores en cuanto al mecanismo de liberación de este tipo de compuestos, el cual puede ocurrir por exudación de la raíz y lixiviación de las hojas caídas.

En estudios anteriores realizados por CORPOICA, esta planta no había mostrado presencia de alcaloides, pero en este trabajo se encontraron en gran cantidad en la flor, hojas y tallos, en sus tres estados de crecimiento. Su notable presencia se debió, posiblemente, a que este tipo de compuestos se halla restringido a ciertos órganos de la planta en su etapa de crecimiento, así como a su expresión, que estaría determinada por condiciones ambientales. De otra parte, se vio cómo los extractos con concentración de 1% en hoja, tallo y raíz, inhibieron la germinación de las especies empleadas, lo cual indica que en bajas concentraciones contienen sustancias con un alto poder alelopático. También se encontró que los extractos de tallo inhibieron la germinación del rábano. La longitud del tallo fue inhibida por los extractos más concentrados, los extractos del primer y tercer estado de desarrollo inhibieron en mayor grado la longitud de la raíz, y el peso seco fue más afectado por la concentración al 5%. (Tabla 6). Como resultado de la caracterización cualitativa cromogénica y a través de la cromatografía de capa delgada, se identificaron los siguientes compuestos posibles en hojas, tallo, raíz y flor: flavonoides, quinonas, alcaloides, glicósidos cumarinas y terpenos.

Al analizar las partes de la planta, las mayores concentraciones de metabolitos se encontraron en raíz, hoja y flor, siendo menor la proporción en el tallo debido a los mecanismos de liberación que utiliza la planta.

Cultivo de callos y células en suspensión de *R. crispus* para aumentar la producción de metabolitos secundarios

El cultivo de callos y células en suspensión se hizo a partir del 81.2% de las hojas y del 66.67% de tallos y raíces del material inicial.

Se realizó el seguimiento de producción de callos a partir de partes provenientes de hojas, de raíces jóvenes y de los tallos (Figura 2). Se obtuvo una gran cantidad de callos de *Rumex crispus*, utilizando el medio auxina-citoquinina. En todos los órganos sembrados en los medios de cultivo, se observó la formación de callos de dos clases: una masa callosa de color café oscuro y otra de café claro. La producción de células embriogénicas se llevó a cabo durante tres meses, tiempo durante el cual se cambió periódicamente el medio para renovarlo y la producción fue determinada microscópicamente.

Durante la producción de callos se observó el 'pardeamiento' de la mayoría de órganos inducidos a la formación de callo, así como en los callos desarrollados, presentando diversos grados de coloración, desde café claro hasta café muy oscuro, casi negro. La coloración oscura es atribuible a la producción de fenoles en el cultivo.

Con este sistema de cultivo se obtuvo una gran producción de flavonoides, en especial chalconas, auronas, flavonoles y flavonolas, pero una menor cantidad de los otros compuestos encontrados con las técnicas cromatográficas, como hidroquinonas, terpenos y triterpenos. La gran producción de fenoles, posiblemente inhibió el crecimiento de las células en suspensión no permitiendo la regeneración de plantas de *Rumex crispus*. De otra parte, el callo presentó formas irregula-

Tabla 6. Efecto del extracto etanólico de *P. segetum* sobre la germinación y crecimiento del rábano

Estado	Germinación, % inhibición		Longitud tallo, % inhibición			Longitud raíz, % inhibición			Peso fresco mg		
	Tallo		Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja
A											
10-15 cm	100b		-46.69c	-12.51b	1.11a	-6.03bc	9.22a	-28.12a	1.55a	1.19a	1.16a
B											
20-25 cm	100de		-24.6a	-16.42b	13.43b	-40.98d	-41.6d	-0.81b	1.45a	1.19a	1.02a
C >30 cm con flor	100f		-3.79a	6.13a	-22.13c	-9.44a	48.32d	-8.68c	1.53a	1.06a	1.11 a

*Los valores acompañados con diferente letra dentro de la misma especie difieren al 0.05 % según la prueba de Tukey.

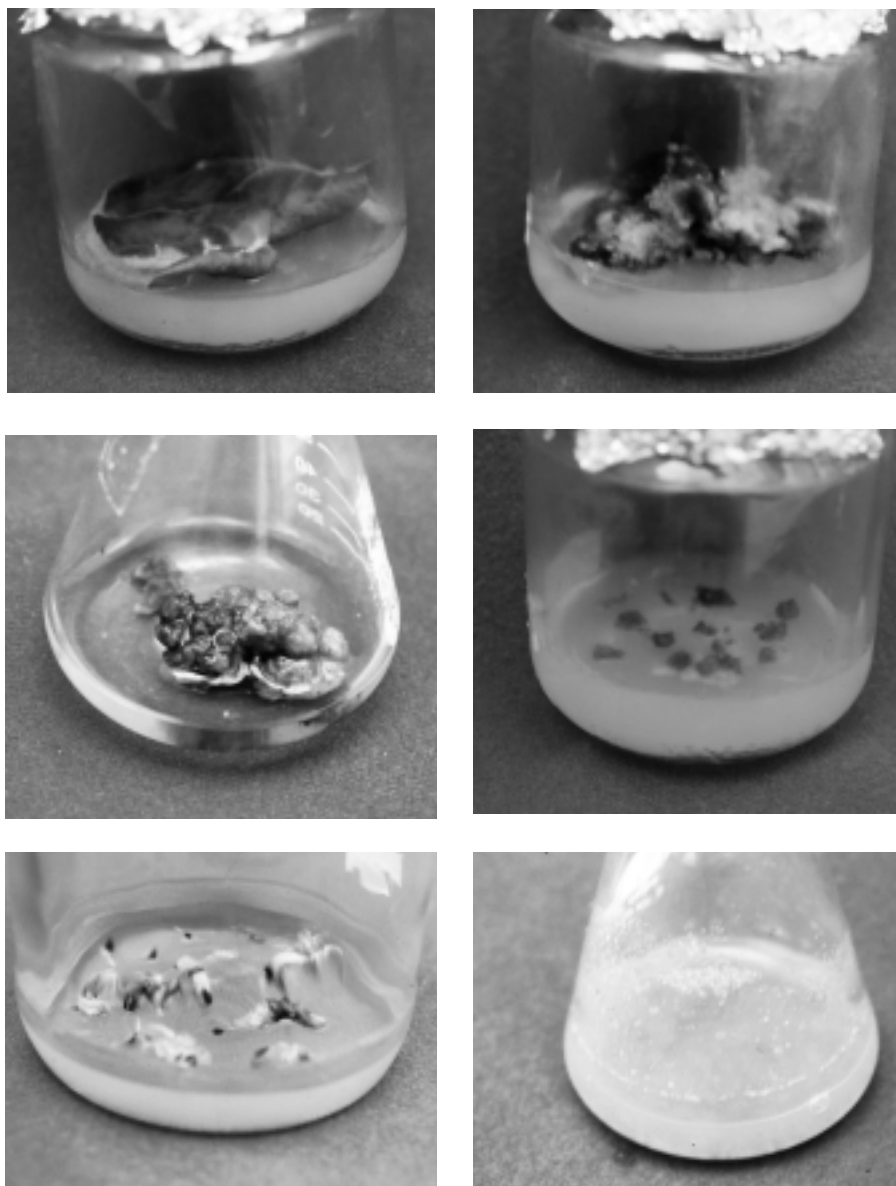


Figura 2. Secuencia de la obtención de callos en las diferentes partes de la planta de *R. crispus*, hasta la obtención de células embriogénicas en suspensión: a) Inicio de la formación de callo; b) Diferenciación; 3) Callo maduro; 4) Callos separados; 5) Producción de plántulas a partir de callos; 6) Células en suspensión.

res, lo cual pudo llevar a la conformación de tipos de células maduras dentro de una planta, pues en general los callos no tienen composición uniforme y sufren cambios con la edad del cultivo. De acuerdo con varios investigadores (Flores y Curtis, 1992; Flores y Medina, 1995), la máxima acumulación de productos secundarios ocurre cuando el ritmo de crecimiento de los cultivos celulares decrece; en este experimento, cuando los callos habían adquirido un tamaño aconsejable de 1 cm de diámetro y se colocaron en el agitador horizontal, no permitieron la regeneración de plántulas a partir de células embriogénicas.

La proliferación de células en suspensión se llevó a cabo durante dos meses, se

obtuvieron excelentes resultados que concuerdan con las investigaciones realizadas en ese campo en otras plantas; el tratamiento con benzil amino purina y ácido indol acético produjo un gran número de células a partir de los callos, presentándose un tejido parenquimatoso capaz de una proliferación indefinida. De acuerdo con Roca y Mroginski (1991), la máxima acumulación de productos secundarios ocurre cuando el ritmo de crecimiento de los cultivos celulares decrece; en esta investigación cuando los callos habían adquirido un tamaño de 1 cm de diámetro y se colocaron en el agitador horizontal, aumentaron los metabolitos secundarios.

Es importante tener en cuenta que Flores y Curtis (1992) basaron sus estudios de identificación de metabolitos secundarios en cultivos in vitro de raíces de plantas, encontrando compuestos como alcaloides; además, se ha reconocido el cultivo de células en suspensión como una alternativa para la producción de metabolitos secundarios y se recomienda la utilización de callos y producción de células para la producción de metabolitos del tipo bioherbicidas. El *R. crispus* se ha constituido en una alternativa para la producción de este tipo de compuestos, en especial durante las primeras etapas de producción de células embriogénicas, etapas en donde se producen en mayor cantidad estos compuestos químicos. En relación con las quinonas y terpenos, se pudo observar que si bien su producción no es tan alta como la de flavonoides, se mantiene constante durante el transcurso del tiempo.

Conclusiones

A partir de los resultados citados es posible concluir:

- Las semillas de trigo y rábano son buenas indicadoras del efecto alelopático.
- Los extractos acuosos y etanólicos de *Rumex crispus* y *Polygonum segetum* poseen actividad alelopática.
- A mayor concentración de extractos de hojas y raíces de *Rumex* se presenta un mayor efecto sobre la germinación de especies indicadoras.
- Los extractos más concentrados de hojas y raíces de *Polygonum* inhiben la elongación de la radícula en el trigo y del vástago en la remolacha.
- Las sustancias alelopáticas de *Rumex* y *Polygonum* son solubles en agua; posiblemente la precipitación, que permite el lavado de las hojas y la exudación de las raíces, sea el mecanismo plausible para explicar la liberación de esas sustancias al medio ambiente.
- Los compuestos presentes en todos los estados de *Rumex* corresponden principalmente a flavonoides, quinonas y terpenos.
- En las hojas de *Rumex* los compuestos corresponden a: flavonoides, 5-deoxiflavonas, 7-8 dihidroxiflavonas, ácidos fenólicos, ferúlico y caféico. En las raíces, a flavonoides, glicósidos de flavonol y ácido sinápico.
- En hojas de *Polygonum* los compuestos identificados fueron: flavonoides, flavonoles y flavonas. En raíces fueron: flavonoides, 5-deoxiflavonas, glicósi-

dos de flavonol, glicósidos de flavona, ácido sinápico.

- Las sustancias alelopáticas provenientes del metabolismo secundario de *Rumex* se pueden concentrar en mayor proporción en las fracciones de cloroformo, acetato de etilo y en bencina de petróleo.

- Es posible obtener callos de *Rumex crispus* con una morfología particular de formación de callo, mediante la transferencia de células embriogénicas.

- Con el sistema de células en suspensión aumenta la concentración de metabolitos secundarios, especialmente los que pertenecen al grupo de los flavonoides, y en menor proporción los de las quinonas y terpenos.

- La producción de metabolitos secundarios en *Rumex crispus* se inicia desde el momento en que se desarrolla la planta, pero la mayor producción y concentración ocurre cuando los callos son sometidos a la producción de células embriogénicas en suspensión.

- Las sustancias alelopáticas provenientes del metabolismo secundario de *Rumex* se pueden concentrar en mayor proporción en las fracciones de cloroformo, acetato de etilo y en bencina de petróleo.

- Es posible obtener callos de *Rumex crispus* con una morfología particular de formación de callo, mediante la transferencia de células embriogénicas.

- Con el sistema de células en suspensión aumenta la concentración de metabolitos secundarios, especialmente los que pertenecen al grupo de los flavonoides, y en menor proporción los de las quinonas y terpenos.

- La producción de metabolitos secundarios en *Rumex crispus* se inicia desde el momento en que se desarrolla la planta, pero la mayor producción y concentración ocurre cuando los callos son sometidos a la producción de células embriogénicas en suspensión.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, M., Srivastava, R.P., Proksch, P. and Gras, V. 1990. Isoflavan-OL-dihydroxichalcone and chalcone derivatives from *Polygonum lapathifolium*. *Phytochemistry* 29(6): 2009-2011.

Anaya, A. L. 1989. La alelopatía y el manejo de los recursos naturales: mitos, realidades y perspectivas. Resumen Ia. Reunión de Ecología Química. Instituto de Fisiología Celular y Centro de Ecología, Universidad Autónoma de México. UNAM. 48 pp.

Arango, R. 1997. Determinación y caracterización del potencial alelopático de las poligonáceas *Rumex crispus* y *Polygonum segetum* H.B.K. y su efecto sobre varias especies cultivables. Tesis para optar al Título de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. 150 pp.

Datta, S. C. and Chatterjee, A. K. 1978. Some characteristics of an inhibitory factor in *Polygonum orientale* L. *Indian J. Weed Sci.* 10: 23-33.

Einhelling, F. A. and Rasmussen, J. A. 1973. Allelopathic effects of *Rumex crispus* on *Amaranthus retroflexus* grain sorghum and field corn. *Am. Mid Nat.* 90: 79-86.

Flores, H. and Curtis, W. 1992. Approaches to understanding and manipulating the biosynthetic potential of plant roots. *Annals of the New York Academic Sciences.* 665(13): 188-209.

Flores, H. and Medina, F. 1995. Root culture and plant natural products "unearthing" the hidden half of plant metabolism. *Plant Tissue, Culture and Biotechnology.* August 1 (2): 45-49.

Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical methods.* New York, Tokio, Melbourne; Chapman and Hall, 2nd edition, 37-46 p.

Olofsdotter, M. and Mallik, A.U. 2001. Allelopathy Symposium. *Agronomy Journal.* 93 (1): 1-2.

Putnam, A. R and Cung, M. 1986. *The Science of Allelopathy.* John Wiley & Sons Inc. New York, 1.046 pp.

Rice, E. L. 1984. *Allelopathy.* Academic Press. Orlando, Florida. U.S.A. 424 pp.

Risvi, S. H. H and RISVI, V. 1992. *Allelopathy Basic and Applied Aspects.* Department of Botany and Plant Physiology. University India. Chapman & Hall. 240 pp.

Roca, M. y Mroginsky, L. 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.* Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Colombia. 968 pp.