

INHIBIDORES EN PEUMUS BOLDUS MOL. (MONIMIACEAE) (ALELOPATIA)

POR

PEDRO MANCINELLI (*) y MIREYA ABARZUA

RESUMEN

Se analiza el efecto inhibitor de esencia de hojas de boldo (*Peumus boldus* Mol.), ascaridol, cineol, eugenol, dipenteno, p-cimol y terpineol sobre germinación y crecimiento. Se interpreta la acción alelopática del boldo a través de algunos de estos compuestos.

ABSTRACT

Essential oil of boldo leaves (*Peumus boldus* Mol.), ascaridole, cineole, eugenol, dipentene, p. cimol and terpineol inhibitory effects are analyzed. Allelopathic effect of boldo tree is discused through some of these terpenes.

INTRODUCCION

Existen numerosas plantas que pueden ejercer un efecto inhibitor sobre la vegetación que crece a su alrededor bajo la influencia de su follaje. Esta acción inhibitora no es el resultado de una competencia frente a factores ambientales como la luz, agua o nutrientes inorgánicos, sino que es producida por sustancias químicas exudadas por las raíces, o desprendidas por la parte aérea del vegetal (Rice, 1974).

Se ha propuesto el nombre de alelopatía (Molish, 1937, Evannari, 1961), para describir la acción negativa de una planta sobre otra, por medio de sustancias desprendidas al medio ambiente (Muller, 1965), recibiendo éstas el nombre de aleloquímicos (Whittaker & Fenny, 1971). El evento fisiológico es de gran importancia ecológica, ya que puede sincronizar al clima, con la planta inhibitora y la vegetación sobre la cual se ejercen los efectos negativos. En el Chaparral californiano el efecto alelopático está relacionado con el clima mediterráneo y el carácter anual de la cubierta herbácea, donde la germinación y el establecimiento de las plántulas —el período más crítico y vulnerable en la vida de las plantas— coincide con la evolución de las lluvias y el desprendimiento de aleloquímicos.

(*) Depto. de Botánica. Instituto de Biología. U. de Concepción.

Terpenos, fenoles y otros compuestos más complejos, engloban a la mayoría de los aleloquímicos hasta ahora detectados (Bonner 1950, Evenari 1949, 1961; Leopold 1964; Muller et al 1964; Muller y Chou 1972). En el Chaparral californiano, alcanfor, cineol y dipenteno se les ha encontrado con frecuencia como inhibidores (Muller 1965, 1966).

Se ha demostrado la existencia de cineol y dipenteno, junto a otros compuestos en extractos de hojas de boldo (Bolado y Montes 1965), lo que constituye la base de este trabajo para investigar la acción alelopática del boldo.

MATERIALES Y METODOS

Se usó en general reactivos E. Merck A. G. Darmstad p.a., los terpenos ascaridol, cineol, dipenteno, eugenol, p-cimol y terpineol son de Fluka A. G. Buchs p. a.

Las semillas de *Lactuca sativa* L. cultivar Grand Rapids (Lechuga) provienen de Ferry Morse Seed Co. Inc. Mountain View. Cal. USA. La esencia de boldo usada contiene 28% de ascaridol y 51% de cineol. No se pudo cuantificar el resto de los terpenos.

CROMATOGRAFIA.

Se utilizó cromatografía ascendente en papel (Whatman N° 1), usando como fase de desarrollo una mezcla de éter de petróleo (P. E. 60-80°C); acetato de etilo, (85:15), (Bolado y Montes 1965).

Tanto la esencia de boldo como los terpenos se diluyeron en éter etílico al 0,1% y los orígenes de los cromatogramas se sembraron en línea con 1 ml de solución. Los cromatogramas de terpenos en mezcla, se sembraron en forma consecutiva con 1 ml de cada uno de ellos en solución, dejando evaporar el solvente después de cada aplicación.

Las bandas de papel filtro para los cromatogramas de esencia de boldo y de los terpenos en mezcla son de 56 × 12 cm., y para la identificación de terpenos y determinación de sus Rf, se usó bandas de papel filtro de 56 × 4 cm., revelando con vapores de yodo. Los cromatogramas se desarrollaron hasta 30 cm. desde la línea de origen, ubicada a 5 cm. del extremo inferior.

BIOENSAYOS DE GERMINACION.

En todos los bioensayos de germinación se usó placas Petri de 45 mm Ø con 25 semillas de lechuga más 2 ml de agua destilada.

Se analizaron los cromatogramas de esencia de boldo y de los terpenos en mezcla, colocando un trozo de cromatograma correspondiente a un Rf determinado (Rf 0.1 al 1.0), en sendas placas Petri y utilizando como control la parte inferior del cromatograma que solo ha estado en contacto con el solvente.

Se ensayó además, los terpenos por separado y la esencia de boldo directamente, colocando 0.8 ml al 0.1% en éter etílico y de-

jando evaporar antes de colocar las semillas y agregar agua destilada. Se incubó a la obscuridad a 21° C durante 48 hrs., en una estufa Heraeus modelo KB 600.

Se contó el número de semillas germinadas y no germinadas y los resultados se analizaron estadísticamente por χ^2 .

BIOENSAYOS DE CRECIMIENTO.

Se utilizó placas de igual tamaño y la misma técnica anterior colocando ahora 12 semillas germinadas de lechuga, con sus radículas de 3-5 mm de longitud, para analizar el efecto de la esencia de boldo, de cada uno de los terpenos, de los cromatogramas de esencia de boldo y de terpenos en mezcla. Se les agregó también 2 ml de agua destilada y se incubó durante 72 hrs. bajo luz fluorescente continua (3.500 lux). Luego se midió los hipocotilos bajo una lupa estereoscópica Zeiss (Frankland & Wareing, 1960), y los resultados se analizaron estadísticamente por "t".

RESULTADOS

El efecto inhibitor sobre la germinación se debe a cuatro de los terpenos analizados y esto también se observa en los cromatogramas de ellos en mezcla y en los de esencia de boldo (Tablas I, II y III), en los cuales aparecen cuatro zonas de Rf con una intensa actividad inhibitora que debe corresponder al efecto de Eugenol-Terpineol y Ascaridol-Dipenteno. No se puede establecer una diferencia neta, debido a que en las condiciones del diseño experimental usado, los Rf de las parejas de terpenos son muy parecidas. Los cromatogramas de los terpenos mencionados, al ser revelados con vapores de yodo, confirman la posición de los Rf de actividad alelopática en la esencia de boldo y puede afirmarse, que el efecto inhibitor que presenta la esencia de boldo usando test de germinación se debe entre otros, a la presencia de Eugenol, Terpeneol, Ascaridol y Dipenteno (Tablas II y III).

TABLA I

EFFECTO DE TERPENOS Y ESENCIA DE BOLDO SOBRE GERMINACION*

	Control	Eug.	Terp.	p-Cim.	Asc.	Cin.	Dip.	Boldo**
Germinadas	25	01	00	25	00	25	01	00
No germinadas	00	24	25	00	25	00	24	25
% germinadas	100	04	00	100	00	100	04	00

*Semillas de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Las abreviaturas corresponden a Eugenol, Terpeneol, p-cimol, Ascaridol, Cineol y Dipenteno.

T A B L A II
EFECTO DE TERPENOS SOBRE GERMINACION*

Zonas de Rf**	Control	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9	1.0
Germinadas	13	13	10	5	1	4	0	0	0	0	13
No germinadas	8	8	15	20	24	21	25	25	25	25	8
% germinadas	100	100	77	38	5	31	00	00	00	00	100

*Semillas de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Cromatograma de terpenos en mezcla.

T A B L A III
EFECTO DE ESENCIA DE BOLDO SOBRE GERMINACION*

Zonas de Rf**	Control	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9	1.0
Germinadas	21	20	13	16	13	00	00	00	00	3	11
No germinadas	4	5	12	9	12	25	25	25	25	22	14
% Germinadas	100	95	62	76	62	00	00	00	00	14	52

*Semillas de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Cromatograma de esencia de Boldo.

Los análisis de los efectos de la esencia de boldo y de los terpenos con plántulas de lechuga, proporcionan más argumentos sobre los efectos inhibitorios.

Los bioensayos de crecimiento con los terpenos en forma separada, demuestran nuevamente el efecto inhibitor de los cuatro terpenos que son también biológicamente activos en la germinación (Tabla IV). En las tablas pertinentes también se incluye los resultados con esencia de boldo, aunque aquí los resultados no son tan drásticos como en el otro proceso fisiológico.

T A B L A IV
EFECTO DE TERPENOS SOBRE CRECIMIENTO*

	Control	Eug.	Terp.	p-Cim.	Asc.	Cin.	Dip.	Boldo**
Longitud (mm)	2.69	0.00	0.00	2.51	0.00	2.40	0.00	0.00
% crecimiento	10	00	00	93	00	89	00	00

*Hipocotilos de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Las abreviaturas corresponden a Eugenol, Terpineol, p-Cimol, Ascaridol, Cineol, Dipenteno y Boldo.

Al analizar los bioensayos de crecimiento con cromatogramas de terpenos en mezcla, es posible apreciar un efecto inhibitorio, pero en forma más atenuada si se la compara con los análisis similares efectuados en germinación (Tabla V). Algo semejante se observa en los cromatogramas de esencia de boldo analizados en los mismos bioensayos (Tabla VI).

TABLA V
EFECTO DE TERPENOS SOBRE CRECIMIENTO*

Zonas de Rf**	Control	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9	1.0
Longitud (mm)	2.3	2.9	2.6	2.4	2.6	2.9	2.1	2.1	1.9	1.8	2.7
% crecimiento	100	113	101	94	103	113	71	82	75	69	104

*Hipocotilos de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Cromatograma de terpenos en mezcla.

TABLA VI
EFECTO DE ESENCIA DE BOLDO SOBRE CRECIMIENTO*

Zonas de Rf**	Control	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9	1.0
Longitud (mm)	2.8	2.9	2.7	2.8	2.6	2.5	2.6	2.2	1.7	1.8	2.4
% crecimiento	100	103	96	101	92	91	93	79	61	65	85

*Hipocotilos de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Cromatograma de esencia de Boldo.

Los ensayos con hojas de boldo muestran evidentes efectos inhibitorios sobre la germinación y el crecimiento (Tablas VII y VIII) llamando la atención la coloración pardo que toman solamente las raíces en las placas con los discos de boldo. Este efecto fue además, observado en los ensayos preliminares con esencia de boldo concentrado, produciéndose incluso necrosis en las raíces.

TABLA VII
EFECTO DE HOJA DE BOLDO SOBRE GERMINACION*

	Control	4	8	16	32 (mg)**
Germinadas	25	21	4	1	0
No germinadas	0	4	21	24	25
% Germinación	100	8	16	4	00

*Semillas de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Discos de hoja de boldo de 6 mm Ø.

TABLA VIII
EFECTO DE HOJA DE BOLDO SOBRE CRECIMIENTO*

	Control	4	8	16	32 (mg)**
Longitud (mm)	3.83	3.80	3.71	3.46	2.69
% crecimiento	100	99	97	90	70

*Semillas de lechuga cultivar Grand Rapids.

**Discos de hoja de boldo de 6 mm Ø.

DISCUSION

Los análisis de la acción sobre la germinación y el crecimiento, señalan que existe un efecto inhibitor (Tablas I y IV), producido por la esencia de boldo y por algunos de los terpenos detectados en ella (Bolado y Montes 1965). No podemos decir que los terpenos detectados, sean los únicos aleloquímicos presentes, ya que el método de extracción en corriente de vapor podría eliminar a compuestos termolábiles, o bien la volatilidad podría dejar fuera a algunos de ellos. Por otra parte, la determinación arbitraria de los Rf de actividad biológica, dividiendo en 10 partes iguales la zona de los cromatogramas por donde ha ascendido el solvente, puede dejar a dos o más inhibidores en una misma zona de Rf, o bien producir lo contrario, dando como resultado, que la actividad biológica de un solo compuesto, por su abundancia, aparezca en dos o más zonas contiguas del cromatograma (Tablas III y VI).

No existe la menor duda acerca de la acción de los terpenos, Ascaridol, Dipenteno, Eugenol y Terpeneol sobre la germinación y crecimiento. Los resultados de los bioensayos permiten señalar bajo las condiciones del diseño experimental utilizado, que una parte importante del efecto inhibitor de la esencia de boldo, se debe a estos Terpenos (Tablas I y IV). Llama la atención la falta de actividad inhibitoria demostrada por el cineol, que junto con el ascaridol son los más abundantes en el boldo (Wilkomirsky, F. T. comunicación personal), compuesto que se sabe que tiene efecto aleloquímico (Muller & Muller, 1964).

Los análisis del efecto de la hoja de boldo sobre los mismos procesos fisiológicos, no hacen más que confirmar lo ya encontrado para la esencia y para los terpenos utilizados a través de las investigaciones (Tablas VII y VIII). Este trabajo continúa en progreso.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la gentileza de la Prof. Tatiana Wilkomirsky F. del Depto. Farmacia Química, Escuela de Química Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Concepción, por proporcionar los Terpenos.

Se agradece al Sr. José Becerra del Depto. de Botánica, Instituto de Biología, Universidad de Concepción, por la esencia de boldo proporcionada.

Asimismo se agradece la valiosa cooperación del Dr. M. Silva en la corrección del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- Bolado, L. M. y M. Montes, 1965. Ensayos en aceites esenciales. Rev. Real Acad. Cienc. Exact. Fis. y Nat. Madrid. Tomo LIX, Nº 2.
- Bonner, J. 1950. The role of toxic substances in the interaction of higher plants. Bot. Rev. 16 : 51-65.
- Evenari, M. 1949. Germination Inhibitors. Bot. Rev. 15 : 153-194.
- Evenari, M. 1961. In Handbuch d. Pflanzenphysiologie (W. Ruhland, ed.). Springer Verlag. XVI, pp. 691-736.
- Frankland, B. and P. Wareing. 1960. Effect of gibberellic acid in growth of hypocotyl of lettuce seedling. Nature 185:255.
- Leopold, A. C. 1964. Plant Growth and Development. McGraw-Hill. New York. 144-157 pp.
- Molish, H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopatie. Jena.
- Muller, C. H. 1965. Inhibitory terpenes volatilized from Salvia shrubs. Bull. Torrey Bot. Club 92 : 38-45.
- Muller, C. H. 1966. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition. Bull. Torrey Bot. Club 93 : 332-351.
- Muller, C. H. and C. Chou. 1972. En Phytochemical Ecology (J. B. Harbone, ed.) Academic Press, London, pp. 201.
- Muller, W. H. and C. H. Muller. 1964. Volatile growth inhibitors produced by Salvia species. Bull. Torrey Bot. Club. 91 : 327-330.
- Rice, E. L. 1974. Allelopathy. Academic Press. New York. pp. 3-11.
- Whittaker, R. H. and P. P. Feeny. 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. Science 171 : 757-770.