

Autotoxicidad en *Tithonia tubaeformis* como un posible mecanismo de control a la invasión

VÍCTOR D JUÁREZ & ADA V CAZÓN✉

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Argentina

RESUMEN. El noroeste argentino está invadido por *Tithonia tubaeformis*, planta originaria de México. Se encuentra como maleza en cultivos de maíz, sorgo y poroto. Extractos acuosos de la parte aérea de *Tithonia tubaeformis* fueron fraccionados en n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. El extracto clorofórmico de tallos/hojas presentó menor porcentaje de germinación. Por cromatografía TLC sobre sílica gel se separó un flavonoide (5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona) y se determinó su estructura por métodos espectroscópicos. Se realizaron bioensayos con tres concentraciones del flavonoide (0.5, 1.5 y 3.5 mg/mL). Se encontró un mayor efecto inhibitorio a la concentración más alta.

[Palabras clave: aleloquímicos, flavonoides, alelopatía, cromatografía, fitotóxico]

ABSTRACT. Autotoxicity in *Tithonia tubaeformis* as a mechanism of invasion control: In the last decades, the study of biological invasions has increased, as one of the components of global change and biodiversity losses. *Tithonia tubaeformis*, a plant from Mexico, is an invasive species in Northwestern Argentina. *Tithonia tubaeformis* appeared in the Lerma Valley (Salta) in 1978, and is found as a weed in corn, sorghum, and bean crops. The invasion success of this plant is related to its reproductive rate. This species produces more than 3000 fruits per plant. Dry tissues of the inflorescence, leaf and stem were macerated separately in distilled water and the extraction of the compounds was conducted using n-hexane, chloroform and ethyl acetate. Bioassays were run in triplicate, following a randomized design in a germination chamber, using 20 seeds per container. Each container was moistened with the different extracts separately. Chloroform extracts from stems and leaves were more inhibitor of germination. From these extracts a TLC chromatography was conducted on silica gel and a flavonoid (5,3'-dihydroxy-7,4'-dimetoxiflavone) has been isolated and their structure determined by spectroscopic means. Three flavonoid concentrations (0.5, 1.5 and 3.5 mg/mL) were used in a bioassay. We determined a higher inhibitor effect at 3.5 mg/mL concentration.

[Keywords: allelochemicals, flavonoids, allelopathy, chromatography, phytotoxic]

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las invasiones y la pérdida de biodiversidad han aparecido más y más como uno de los componentes del cambio global. El noroeste argentino está invadido por *Tithonia tubaeformis* Jacq. Cass. (Asteraceae), planta originaria de México. En

el Valle de Lerma (Salta) apareció en 1978. En la ciudad de Salta se la encuentra en diferentes sitios tales como banquinas, ambientes perturbados por acción humana (tala, incendio y basura), terrenos baldíos y, como maleza, en cultivos de maíz, sorgo y poroto. Ha sido declarada plaga nacional por disposición N° 284/83 de la Secretaria de

✉ Cátedra de Química Orgánica. Fac. de Cs. Naturales. Univ. Nacional de Salta. Av. Bolivia 3150. 4400 Salta. Argentina. Fax: 54-0387-4255455. cazon@unsa.edu.ar

Recibido: 4 de enero de 2002; Fin de arbitraje: 3 de abril de 2002; Revisión recibida: 2 de septiembre de 2002; Versión final recibida: 24 de febrero de 2003; Aceptado: 7 de marzo de 2003

Agricultura y Ganadería de la Nación (Juarez & Cazón 1999). Son pocos los estudios que se han realizado para conocer sus características invasoras y las posibilidades de control.

Algunas especies exóticas poseen sustancias alelopáticas que podrían facilitar su potencial invasor y dominador (Ramírez & Di Stefano 1994). La alelopatía, originalmente propuesta por Molisch en 1937 (Choesin & Boerner 1991), ha sido definida como la ciencia que estudia cualquier proceso que involucre metabolitos, preferentemente secundarios, de origen vegetal o microbiano, que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos. Se ha sugerido que es un factor importante en la regulación de la estructura de las comunidades vegetales y en la velocidad de crecimiento de las plantas, y ha sido atribuida a flavonoides, estructuras fenólicas y terpenoides (Whittaker & Feeny 1971; Wardle et al. 1996; Cazón et al. 2000). Los metabolitos secundarios pueden actuar como inhibidores o facilitadores de la germinación, del crecimiento sobre otras plantas y sobre ellas mismas (autotoxicidad); este último proceso ha sido implicado en problemas importantes de agricultura (Warrag 1995). Estudios realizados sobre *Tithonia tubaeformis* permitieron aislar flavonoides: 4',6,7-trimetoxi-5,8-dihidroxiflavona (La Duke 1982), 4',7-dimetoxi-3' hydroxiflavona (Correa & Cervera 1971) y lactonas sesquiterpénicas (Ortega et al. 1971).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial autotóxico de la parte aérea (capítulos, tallos y hojas) de *Tithonia tubaeformis* y determinar los metabolitos responsables de esa interacción.

MÉTODOS

Se trabajó con la parte aérea de *Tithonia tubaeformis* recolectada en Las Cortadas, al sur de la ciudad de Salta, Argentina, en abril de 1999. Se separaron capítulos, hojas y tallos. El material vegetal (300 g) se secó al aire a temperatura ambiente durante 15 días. Se molió y guardó en recipientes cerrados en ausencia de luz. Luego se maceraron por separado tallos/hojas y capítulos, con 3 L de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó metanol hasta alcanzar una relación 1:5:10 (mate-

rial vegetal:metanol:agua) y se dejó en contacto durante 48 h. El macerado se filtró y concentró aproximadamente hasta 1 L en evaporador rotatorio al vacío (Cazón et al. 2000). Finalizada esta operación, el extracto acuoso se dividió tres veces con 100 mL de cada uno de los siguientes solventes: n-hexano, cloroformo y acetato de etilo, dando como resultado 300 mL de cada uno de los extractos orgánicos que luego fueron secados con 1 mg de sulfato de sodio anhidro, filtrados y concentrados en rota vapor a presión reducida hasta sequedad.

El efecto autotóxico de los distintos extractos orgánicos se evaluó con un bioensayo en cámara de cultivo, con fotoperíodo de 12 h a 23°C durante 15 días, siguiendo un diseño al azar con tres réplicas por tratamiento. Se colocaron 20 semillas de *Tithonia tubaeformis* en cajas de Petri de 10 cm, usando como soporte 40 g de arena esterilizada en estufa a 150°C, durante 2 días. Se embebió cada caja de Petri con 2.5 mL (0.5 mg/mL) de los distintos extractos. Se usaron controles con solventes puros (n-hexano, cloroformo y acetato de etilo) y agua destilada. Una vez evaporados los solventes, se colocaron las semillas y se regó todos los días con 5 mL de agua destilada. Cada dos días se registró el número de semillas germinadas, considerando como criterio de germinación la emergencia de la radícula. Las plántulas de *Tithonia tubaeformis* no fueron removidas de las cajas de Petri hasta el final del experimento.

La germinación de *Tithonia tubaeformis* se evaluó como porcentaje de germinación (número de semillas germinadas x 100/20) y por el índice S de velocidad de germinación (Ahmed & Wardle 1994), como:

$$S = (N_1/1 + N_2/2 + \dots + N_n/n) \times 100 / 1$$

donde N_1, N_2, \dots, N_n son las proporciones de semillas que germinaron en los días 1, 2, ..., n durante el bioensayo. S varía entre 100 (si todas las semillas germinaron el primer día) y 0 (si las semillas no germinaron al final del experimento). El cálculo de S se realiza por ser un indicador más sensible del potencial alelopático que el porcentaje de germinación (Wardle et al. 1991). A las diferentes variables se les aplicó una Prueba de Homogeneidad de Varianza (Bartlett) y se determinó el

Coefficiente de Variación. Los datos se compararon mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis.

Cada uno de los extractos orgánicos fue analizado paralelamente por cromatografía en capa fina (TLC). Se sembró en placas de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄' desarrollando las mismas en benceno:dioxano:ácido acético (120:20:4). El revelado de los cromatofolios se realizó con lámpara UV₂₅₄ y con ácido sulfúrico:agua:ácido acético (1.6:0.4:8).

El extracto clorofórmico (7 g) de tallos/hojas, por ser el que presentó menor porcentaje de germinación, se analizó por cromatografía en columna sobre 100 g de gel de sílice 60 G (Merck; 70-230 mesh). Se usaron como eluyentes mezclas de solventes (100 mL) constituidos por n-hexano, cloroformo y acetato de etilo, con un cambio en polaridad de un 10%, colectando fracciones de 5 mL. Resultó de interés el grupo de fracciones 28-32 (3 g), eluidas en cloroformo:acetato de etilo (110:30), nuevamente analizadas por cromatografía en columna Flash con 50 g de gel de sílice 60°A (Aldrich; 230-400 mesh), utilizando una mezcla de solventes (50 mL) constituidas por cloroformo:acetato de etilo, con un cambio de polaridad de un 10%. De las fracciones 1-2 (9 mg) se aisló un sólido amarillo soluble en cloroformo que, analizado por cromatografía TLC, mostró una sola banda, indicando la presencia de un solo compuesto.

Con el metabolito aislado a partir del extracto clorofórmico de tallos/hojas se realizó un bioensayo siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Se utilizaron cuatro réplicas de las diferentes concentraciones (0.5, 1.5 y 3.5 mg/mL) del compuesto solubilizado en cloroformo, usando como control agua y cloroformo. Se registró a diario el número de semillas germinadas y se determinó el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación. Los datos se compararon mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Para determinar entre qué tratamientos existían diferencias en las velocidades de germinación, se realizó el gráfico de cajas hendidas de Tukey, donde se visualiza el intervalo de confianza para la mediana de cada grupo.

La identificación del compuesto se basó en

reacciones químicas con solución de FeCl₃ 5%, cromatografía TLC sobre gel de sílice expuesta a vapores de amoníaco, análisis de espectros UV-Visible (Model UVGL-58 Multibanol UV-254/366 nm) en metanol, solución de metóxido de sodio y FeCl₃ con agregado de HCl, y análisis de espectros ¹H-RMN en CDCl₃ a 200 MHz con un espectrómetro Bruker A C-200. Se completó el estudio con espectrometría de masa.

RESULTADOS

Durante el bioensayo de los extractos orgánicos de tallos/hojas y capítulos no se observó crecimiento de hongos en ninguno de los tratamientos. Se detectó un retardo del inicio de la germinación de tres días en el extracto clorofórmico de tallos/hojas; en los restantes tratamientos las semillas germinaron a partir del quinto día de iniciado el bioensayo. No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje (KW = 9.358, g.l. = 6, P = 0.154) ni en la velocidad de germinación (KW = 10.736, g.l. = 6, P = 0.097) de *Tithonia tubaeformis* entre los tratamientos (Tabla 1). El menor porcentaje de germinación lo presentó el extracto clorofórmico de tallos/hojas, y el mayor el control de cloroformo (Tabla 1). Esta misma tendencia se observó en la velocidad de germinación: el extracto clorofórmico de tallos/hojas presentó menor velocidad y la mayor velocidad se observó en el control de cloroformo (Tabla 1).

El sólido amarillo presente en las fracciones 1-2 aisladas del extracto clorofórmico por análisis de TLC en placa cromatográfica mostró una banda de color azul revelada con luz UV₂₄₅. Con ácido sulfúrico:agua:ácido acético (1.6:0.4:8) y con vapores de amoníaco dio una banda color amarillo intenso. El ensayo químico con FeCl₃ 5% del metabolito dio una coloración verdosa. El espectro UV-Visible en metanol mostró un hombro a 237 nm (Banda II) y un máximo a 336 nm (Banda I). Se observó un efecto batocrómico en metóxido de sodio de la Banda I a $\lambda_{\text{máx}}$ 380 nm. El mismo efecto se observó con AlCl₃ con $\lambda_{\text{máx}}$ a 250 nm ($\Delta\lambda = 27$) y $\lambda_{\text{máx}}$ a 405 ($\Delta\lambda = 69$), que no se modificó con ácido HCl. El espectro ¹H-RMN (CDCl₃) mostró los siguientes corrimientos (expresados en ppm a partir de TMS y los valores de las constantes

Tabla 1. Tasa de germinación (%) y velocidad de germinación (S) de *Tithonia tubaeformis* expuesta a diferentes tratamientos. Los valores son promedios \pm EE.

Table 1. Germination rate (%) and germination speed (S) of *Tithonia tubaeformis* exposed to different treatments. Values are means \pm SE.

| Tratamientos | Tasa de germinación | Velocidad de germinación |
|--|---------------------|--------------------------|
| Extracto Clorofórmico de tallos/hojas | 15.0 \pm 5.0 | 1.2 \pm 0.5 |
| Extracto Clorofórmico de capítulos | 33.3 \pm 9.3 | 3.1 \pm 1.1 |
| Extracto de acetato de etilo de tallos/hojas | 26.7 \pm 1.7 | 2.3 \pm 0.1 |
| Extracto de acetato de etilo de capítulos | 31.7 \pm 3.3 | 2.9 \pm 0.3 |
| Control de agua | 36.7 \pm 11.6 | 3.9 \pm 1.1 |
| Control de cloroformo | 41.7 \pm 0.9 | 4.4 \pm 0.9 |
| Control de acetato de etilo | 38.3 \pm 6.0 | 3.9 \pm 0.8 |

de acoplamiento en Hz): H₅, 8.15 (d, 7.6), H₂, H₆, 7.45 (dd, 8.3-1.9), H₆, H₈, 7 (m, 8.5), H₃, 6.52 (s), -OCH₃, 4 (s) y 3.9 (s) uno en el anillo A y otro en el anillo B. El espectro de masa mostró los siguientes fragmentos (m/z): 298 (100%), 270 (20%), 255 (35%), 227 (19%) y 251 (15%). Estos resultados permitieron determinar la estructura del metabolito como un flavonoide (5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona).

Las diferentes concentraciones bioensayadas del flavonoide presentaron un retardo del inicio de la germinación de *Tithonia tubaeformis* de dos y tres días; los controles (agua destilada y cloroformo) germinaron a partir del sexto día de iniciado el experimento. Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre los tratamientos (KW = 13.904, g.l. = 4, P = 0.008; Tabla 2). El menor porcentaje lo presentó la concentración más alta del metabolito (3.5 mg/mL) y el mayor porcentaje el control de cloroformo (Tabla 2). La velocidad de germinación

también presentó diferencias significativas (KW = 14.108, g.l. = 4, P = 0.007; Tabla 2). La concentración más alta del metabolito presentó el mínimo de velocidad y el control de cloroformo el máximo (Tabla 2). La velocidad no difirió significativamente entre las diferentes concentraciones bioensayadas del flavonoide, pero éstas presentaron una interacción significativa con los controles (Figura 1).

DISCUSIÓN

La maceración acuosa del material vegetal en laboratorio trata de imitar las condiciones a campo, ya que la lluvia tiene el potencial para transferir los metabolitos desde la parte aérea hacia el sustrato. Estos resultados no se pueden extrapolar a campo, dado que las concentraciones producidas de los metabolitos se desconocen, así como también se desconoce que ocurre con los mismos una vez puestos en contacto con el sustrato, debido al pH, a la humedad, a la microbiota y, es de

Tabla 2. Tasa de germinación (%) y velocidad de germinación (S) de *Tithonia tubaeformis* expuesta a diferentes concentraciones del compuesto fitotóxico. Los valores son promedios \pm EE.

Table 2. Germination rate (%) and germination speed (S) of *Tithonia tubaeformis* exposed to different concentrations of the fitotoxic compound. Values are means \pm SE.

| Tratamientos | Tasa de germinación | Velocidad de germinación |
|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| Fitotóxico 0.5 mg/mL | 3.8 \pm 3.7 | 0.3 \pm 0.3 |
| Fitotóxico 1.5 mg/mL | 3.8 \pm 2.4 | 0.3 \pm 0.2 |
| Fitotóxico 3.5 mg/mL | 2.5 \pm 1.4 | 0.2 \pm 0.1 |
| Control de agua | 16.3 \pm 1.2 | 1.5 \pm 0.2 |
| Control de cloroformo | 21.3 \pm 2.4 | 1.9 \pm 0.2 |

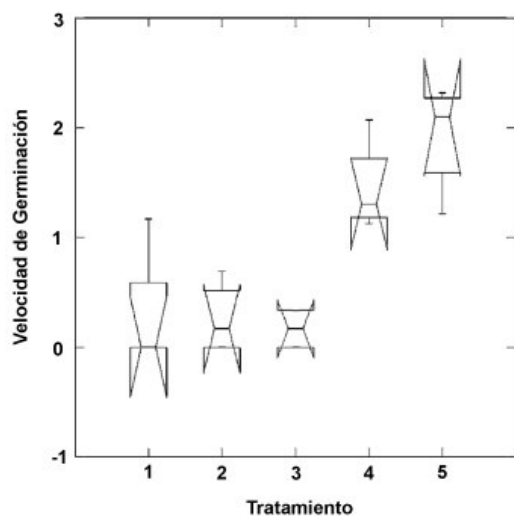


Figura 1. Gráfico de cajas de Tukey de la velocidad de germinación (S) de *Tithonia tubaeformis* expuesta a diferentes concentraciones del flavonoide. 1: 0.5 mg/mL, 2: 1.5 mg/mL, 3: 3.5 mg/mL, 4: control de agua, 5: control de cloroformo.

Figure 1. Tukey's box plots showing germination speed (S) of *Tithonia tubaeformis* exposed to different concentrations of the flavonoid. See treatment codes in the legend above.

esperar, a la variación estacional de los mismos (Heisey 1996).

Los resultados del bioensayo muestran que *Tithonia tubaeformis* presenta una respuesta diferencial a los diferentes extractos orgánicos. El extracto clorofórmico de tallos/hojas presenta un mayor potencial alelopático inhibitorio de la germinación que el extracto clorofórmico de capítulos y los extractos de acetato de etilo de tallos/hojas y de capítulos. El flavonoide determinado en el extracto clorofórmico de tallos/hojas (5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona) es uno de los metabolitos responsables de la inhibición de la germinación de *Tithonia tubaeformis* en laboratorio. Los flavonoides pueden encontrarse como glucósidos solubles en agua y estar localizados en la savia (Strack 1997). En una interacción alelopática pueden influir en el proceso de respiración celular (Seigler 1996).

No se observaron diferencias entre los promedios obtenidos del porcentaje y velocidad de germinación de las diferentes concentraciones bioensayadas del flavonoide, pero

estos valores resultaron menores que los obtenidos para los controles. Además, la más alta concentración del metabolito presentó un mayor efecto fitotóxico inhibitorio.

Para evitar conclusiones erróneas, en los bioensayos de alelopatía es importante experimentar tanto los extractos de partida como los compuestos aislados y sus diferentes concentraciones, ya que los resultados pueden ser diferentes tomando cada extracto por separado (Cazón et al. 2002). Además, se debe tomar en cuenta que a bajas concentraciones el fitotóxico puede presentar baja inhibición o facilitación de germinación, y su incremento puede presentar alta inhibición o producir la muerte de las plantas (Seigler 1996).

Los resultados de este trabajo sugieren que 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona puede ser usada como un compuesto autotóxico inhibitorio de la germinación de *Tithonia tubaeformis*. La ventaja de utilizar estos compuestos naturales con respecto a los herbicidas sintéticos es su selectividad, su baja acumulación y su rápida degradación en el ambiente. Varios factores pueden contribuir a la pérdida de fitotoxicidad. Heisey (1996) encontró que la materia orgánica del suelo disminuye la fitotoxicidad de los ácidos fenólicos y que la degradación microbiana reduce o elimina la fitotoxicidad de algunos aleloquímicos. Se deben hacer estudios a campo para determinar la concentración efectiva en que ocurrirá el efecto autotóxico del flavonoide aislado de *Tithonia tubaeformis* posibilitando el mecanismo de autocontrol de invasión.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el asesoramiento estadístico de la Lic. S. Sühring y al Consejo de Investigación de la UNSa por el subsidio otorgado para realizar esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, M & DA WARDLE. 1994. Allelopathic potential of vegetative and flowering ragwort (*Senecio jacobea* L.) plants against associated pasture species. *Plant Soil* **64**:61-68.
- CAZÓN, AV; ML DE VIANA & JC GIANELLO. 2000. Identificación de un compuesto alelopático

- de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) y su efecto en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae). *Rev. Biol. Trop.* **48**:47-51.
- CAZÓN, A; ML DE VIANA & JC GIANELLO. 2002. Comparación del efecto fitotóxico de aleloquímicos de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae). *Ecología Austral* **12**:73-78.
- CHUESIN, DN & REJ BOERNER. 1991. Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* **78**:1083-1090.
- CORREA, J & ML CERVERA. 1971. Isolement et structure de la tithonine (diméthoxy-4'7 hydroxi-3' flavona). *B. Soc. Chim. Fr.* **2**:475-477.
- HEISEY, RM. 1996. Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. *Am. J. Bot.* **83**:192-200.
- JUAREZ, V & A CAZÓN. 1999. Autotoxicity in *Tithonia tubaeformis* as a mechanism of invasion control. Pp. 68 en: I Camarda & G Brundu (eds). *Actas 5th International Conference on the Ecology of Invasive Alien Plants*. Dipartimento di Botanica ed Ecologia Vegetale. Sardinia.
- LA DUKE, JC. 1982. Flavonoid chemistry and systematics of *Tithonia* (Compositae). *Am. J. Bot.* **69**:784-792.
- ORTEGA, A; C GERRERO; A ROMO DE VIVAR; J ROMO & A PALAFOX. 1971. La orizabina y la zexbrevina B, nuevos germacranolidos furánicos. *Rev. Lat. Quim.* **2**:38-40.
- RAMÍREZ, S & JF DI STÉFANO. 1994. Potencial alelopático de *Gmelina arborea* (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop.* **42**:729-732.
- SEIGLER, DS. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agron. J.* **88**:876-885.
- STRACK, D. 1997. Phenolic metabolism. Pp. 387-416 en: PM Dey & DB Harbone (eds). *Plant biochemistry*. Academic Press. San Diego.
- WARDLE, DA; M AHMED & KS NICHOLSON. 1991. Allelopathic influence of modding thistle (*Carduus mutans* L) seeds on germination and radical growth of pasture plants. *New Zeal. J. Agr.* **34**:185-191.
- WARDLE, DA; KS NICHOLSON & A RAHMAN. 1996. Use of a comparative approach to identify allelopathic potential and relationship between allelopathy bioassays and competition experiments for ten grassland and plant species. *J. Chem. Ecol.* **22**:933-948.
- WARRAG, MOA. 1995. Autotoxic potential of foliage on seed germination and early growth of mesquite (*Prosopis juliflora*). *J. Arid Environ.* **31**:415-421.
- WHITTAKER, RH & PP FEENY. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* **171**:757-770.