

Bioensayo del efecto de fenoles producidos por *Myriophyllum aquaticum* en cultivo sobre *Lactuca sativa*

Bioassay of the effect of phenols produced by *Myriophyllum aquaticum* culture on *Lactuca sativa*

José Luis Viveros-Legorreta^{1,2}, S. S. S. Sarma², Leonor Angélica Guerrero-Zúñiga³ y Angélica Rodríguez-Dorantes¹

¹Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, col. Santo Tomás, CDMX, 11340. México

²Laboratorio de Zoología Acuática, Facultad de Estudios Superiores, Campus Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida de los Barrios 1, col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 54090. México

³Gerencia de Transformación de Biomasa, Instituto Mexicano del Petróleo. Eje Central Lázaro Cárdenas Norte 152, col. San Bartolo Atepehuacan, CDMX, 07730. México
e-mail: rodorantes@yahoo.com.mx

Recibido: 08 de marzo de 2017.

Aceptado: 12 de marzo de 2018.

Viveros-Legorreta J. L., S. S. S. Sarma, L. A. Guerrero-Zúñiga y A. Rodríguez-Dorantes. 2018. Bioensayo del efecto de fenoles producidos por *Myriophyllum aquaticum* en cultivo sobre *Lactuca sativa*. *Hidrobiológica* 28 (1): 109-119.

RESUMEN

Antecedentes. *Myriophyllum aquaticum* presenta una alta plasticidad fenotípica (heterofilia) y su dispersión está en función de su reproducción vegetativa; sus hojas sumergidas poseen características estructurales que permiten la liberación de compuestos orgánicos, dentro de los que se observan compuestos fenólicos. **Objetivos.** El presente estudio analizó el desarrollo de cultivos de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. bajo condiciones de laboratorio, su asociación con la liberación de compuestos fenólicos y evaluó el efecto que producen sobre la germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* L. **Métodos.** Se establecieron cultivos de esquejes emergentes en condiciones de laboratorio para evaluar la producción de compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo. Se evaluó su efecto usando bioensayos con *L. sativa* y mediante la aplicación de índices de fitotoxicidad de los compuestos fenólicos liberados. **Resultados.** La evaluación de la producción de compuestos fenólicos evidenció una relación directa entre esta especie y su comportamiento bajo cultivo, lo que produjo la aceleración en el proceso de liberación de fenoles durante los primeros días de desarrollo. El efecto de los compuestos fenólicos liberados por *M. aquaticum* sobre *L. sativa*, evaluado a través de la comparación de los índices IGN e IER, resultó en que éstos ocasionaron baja toxicidad. **Conclusiones.** La aplicación de bioensayos con la evaluación de *endpoints* de desarrollo temprano de plántulas de *L. sativa* permitieron mostrar el efecto manifiesto de los compuestos fenólicos liberados por las plantas sumergidas de *M. aquaticum*, por lo que se caracterizan como compuestos bioactivos.

Palabras claves: fenoles, *Myriophyllum aquaticum*, *Lactuca sativa*

ABSTRACT

Background. *Myriophyllum aquaticum* has a high phenotypic plasticity and its plant dispersion is a function of its fast vegetative reproduction; its submerged leaves possess structural characteristics that allow the release of organic compounds, among them phenolic compounds. **Goals.** Under laboratory conditions, this study analyzed the development of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. cultures associated with the release of phenolic compounds and evaluated the effect of these compounds on germination and root elongation of *Lactuca sativa* L. **Methods.** Under laboratory conditions, we cultivated emerging shoots of *M. aquaticum* to evaluate their growth and the production of phenolic compounds. We evaluated their effect using bioassays with *L. sativa* and applying phytotoxicity indices to the phenolic compounds released. **Results.** Our evaluation of the production of phenolic compounds found a direct relationship between this plant species and its behavior under cultivation; cultivation caused a quicker release of phenols during the first days of development. These compounds released by *M. aquaticum* on *L. sativa*, as measured by the IGN and IER index comparison, were found to have caused lower toxicity. **Conclusions.** The bioassay application with the evaluation of early development endpoints of *L. sativa* plantlets allowed us to confirm the effect of phenolic compounds released by the *M. aquaticum* submerged plants and characterize them as bioactive compounds.

Keywords: *Lactuca sativa*, *Myriophyllum aquaticum*, phenols

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Myriophyllum* poseen patrones de crecimiento característicos que les han permitido colonizar los hábitats acuáticos; en particular, *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc., es una planta perenne herbácea nativa de Sudamérica, cuya forma de crecimiento acontece de acuerdo con las condiciones ambientales y de cultivo que tenga. Presenta dos tipos de hojas, las cuales pueden crecer juntas en la misma planta. Unas emergen del agua y suelen presentar la forma de plumas de ave, de color grisáceo verde, con estomas, una cutícula gruesa cerosa y foliolos cortos cilíndricos, y las otras son hojas sumergidas, de color típicamente anaranjadas a rojas, no presentan estomas ni cutícula foliar y crecen alrededor de los brotes sumergidos (Mason, 1957; Sutton & Bingham, 1973; Godfrey & Wooten, 1981). Esta especie acuática, al presentar dos formas de crecimiento distintas, posee la ventaja de sobreponerse a los cambios hídricos y ser competitiva sobre otras macrófitas sensibles a los cambios en el ambiente (Wersal & Madsen, 2011). Las plantas acuáticas sumergidas se reconocen como especies que presentan una alta plasticidad fenotípica, por lo que la dispersión de *M. aquaticum* está en función de su capacidad inherente de reproducción vegetativa rápida a partir de fragmentos vegetales (Kane *et al.*, 1991). Asociado a esto, se conoce también que las hojas sumergidas de las angiospermas acuáticas poseen características estructurales que permiten la liberación de compuestos orgánicos (Hutchinson, 1975). Algunos productos del metabolismo secundario de las plantas poseen funciones ecológicas importantes para ellas en su defensa contra patógenos, la herbivoría de vertebrados e invertebrados e incluso algunos se consideran inhibidores del crecimiento del fitoplancton (Nakai *et al.*, 2000). Aunque se sabe que existe una serie de compuestos activos en diferentes macrófitas, la mayoría de éstos aún no están identificados (Gross *et al.*, 2003). Dentro de los compuestos químicos responsables de las interacciones alelopáticas en los sistemas acuáticos se encuentran los compuestos fenólicos, clasificados ampliamente en varios grupos; entre ellos están los fenoles simples y ácidos fenólicos, que han demostrado actividad algicida (D'Abrosca *et al.*, 2006). Los ácidos como el gálico, elágico y pirogálico se han identificado como polifenoles responsables de la actividad algicida de *Myriophyllum spicatum* Linnaeus sobre cianobacterias y algas verdes (Nakai *et al.*, 2000). Se ha reportado también que no afectan el crecimiento de diatomeas (Nakai *et al.*, 2001). Gopal y Goel (1993) y Gross (1999) mencionan que este tipo de compuestos producen efectos tanto benéficos como perjudiciales que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de los sistemas agrícolas y biológicos, por lo que los consideran aleloquímicos que pueden constituir una estrategia adaptativa de las macrófitas sumergidas. Gross *et al.* (2007) sugieren el empleo de homogenados de plantas o de sus extractos para evaluar dichos efectos; por ejemplo, se incluyen muestras de macrófitas frescas o secas que se utilizan sobre organismos prueba y se establecen bioensayos donde los extractos obtenidos de las plantas presentan fitotoxinas liberadas por ellas. Se han reportado algunos bioensayos de este tipo realizados con extracciones directas de plantas acuáticas de *Ceratophyllum demersum* Linnaeus, *Elodea* spp., *Myriophyllum* spp., *Najas marina* Linnaeus y *Stratiotes aloides* Linnaeus (Gross *et al.*, 1996, 2003; Erhard y Gross, 2006; Mulderij *et al.*, 2007). Macías *et al.* (2008) comentan que existe una serie de características que deben tomarse en cuenta cuando se selecciona un bioensayo para el estudio de los efectos de los extractos de plantas acuáticas; entre esas particularidades se incluyen no solamente a las especies de prueba, sino también su forma de crecimiento y fenología.

Callaway y Ridenour (2004) y Morris *et al.* (2009) recomiendan especies sensibles a los efectos alelopáticos sobre aquéllas que en algún sentido coevolucionaron con ellas. Fletcher y Renney (1963) y Nasir *et al.* (2005) sugieren emplear especies de interés agronómico que se han empleado en bioensayos destinados a estudios de alelopatía bioquímica. Elakovich y Wooten (1989), Espen *et al.* (1997), Mishra y Choudhuri (1998) y Tiqua *et al.* (1996) mostraron que los efectos más evidentes de los compuestos tóxicos de plantas acuáticas resultaron en cuanto a la inhibición en la germinación y el crecimiento radical. Las evaluaciones de la tasa de germinación de semillas y la tasa de elongación radical de diferentes especies vegetales han sido de gran valor en los ensayos de fitotoxicidad; y no obstante que no necesariamente reflejen la complejidad de las interacciones entre los organismos que habitan un cierto ecosistema o nicho, pueden dar información preliminar valiosa. Fletcher *et al.* (1988), Sharifi *et al.* (2007), Valerio *et al.* (2007), Di Salvatore *et al.* (2008), Chen *et al.* (2010), Kočí *et al.* (2010), Ling *et al.* (2010) y Violioli *et al.* (2014), reportan que la OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), la US-EPA (US Environmental Protection Agency) y la US-FDA (US Food and Drug Administration) recomiendan a *Cucumis sativus* Linnaeus, *Lactuca sativa* Linnaeus, *Raphanus sativus* Linnaeus, *Trifolium pratensis* Linnaeus, *Triticum aestivum* Linnaeus y *Panicum miliaceum* Linnaeus como las especies más sensibles para este tipo de bioensayos. Dado que los cultivos *in vitro* de plantas acuáticas constituyen sistemas viables para probar los mecanismos que no solamente regulan la regeneración vegetativa tanto de los meristemas preexistentes como del desarrollo de brotes adventicios, éstos permiten también conocer su fisiología. Este trabajo analizó el desarrollo de cultivos de *Myriophyllum aquaticum* bajo condiciones de laboratorio, su asociación con la liberación de compuestos fenólicos y evaluó el efecto que producen sobre la germinación y elongación radical de *Lactuca sativa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del sitio de recolecta del material vegetal. El sitio de recolecta de las plantas de *M. aquaticum* fue la laguna de Salazar; sistema acuático que constituye parte de la cuenca hidrológica del río Lerma y que durante casi todo el año presenta poca profundidad. Se localiza al este de la capital del Estado de México, dentro del Parque Nacional Miguel Hidalgo y Costilla, ubicado en los municipios de Lerma, Ocoyoacac y Huixquilucan, entre las coordenadas 99° 19' 40" y 99° 23' 35" de longitud y entre los paralelos 19° 15' 20" y 19° 19' 20" de latitud (Arriaga *et al.*, 1997; SEDUR, 2010). Las macrófitas presentes en este ecosistema son *Lemna* sp., *Wolffia* sp., *Spirodella* sp., *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Hydrocotyle* sp., *Ceratophyllum demersum* Linnaeus y *Myriophyllum aquaticum*. Este cuerpo de agua presenta características químicas medias anuales de O₂ (10.85 mg/L), conductividad (113.23 mS), pH (8.43), cloruros (16.5 ppm), NH₃ (0.945 ppm), NH₄ (1.01 ppm), NO₂ (0.147 ppm), NO₃ (1.15 ppm), sulfatos (10.5 ppm) y lodos (0.199 ppm) lo que lo caracteriza como un sistema eutrofizado (Hernández, 2013).

Colecta de plantas y establecimiento del cultivo de *M. aquaticum*. Se recolectaron en la laguna de Salazar, en la época de verano, un total de 60 esquejes aéreos de plantas de *M. aquaticum* de aproximadamente 20 cm, luego se colocaron en palanganas con agua de la laguna para su traslado al laboratorio. El establecimiento de los cultivos de las plantas de *M. aquaticum* en el laboratorio partió del lavado de los esquejes colectados con solución jabonosa y enjuague con agua

corriente, para después esterilizarse superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 s, seguida de enjuagues con agua destilada estéril. Se colocaron 10 plantas de 15 cm de longitud previamente pesadas y marcadas en soportes de unicel (30 x 14.5 x 1 cm) perforados con sacabocados de 5 mm de diámetro. Dichas perforaciones se distribuyeron en tres hileras que contenían 10 orificios con una distancia de 1 cm entre cada uno. Se depositaron los soportes con las plantas en acuarios con dimensiones de 30 x 14.5 x 20 cm que se llenaron con 6000 mL de medio EPA (Environmental Protection Agency): 96 mg de NaHCO_3 + 60 mg de CaSO_4 + 60 mg de MgSO_4 + 4 mg de KCl, en un litro de agua destilada (Weber, 2002). Los cultivos se establecieron por cuadruplicado con tres condiciones de crecimiento para la producción de fenoles a los 2, 4 y 6 días, bajo condiciones de iluminación continua con una lámpara de luz fría de 4500 lux ($67.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a temperatura ambiente de $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Al final del tiempo determinado, se evaluó el crecimiento considerando como puntos finales de análisis (*endpoints*) la longitud (cm), el peso fresco (g) y el peso seco (g); el último se obtuvo secando el material vegetal por 24 h en estufa a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Asimismo, se determinó la tasa de crecimiento (TC, %),

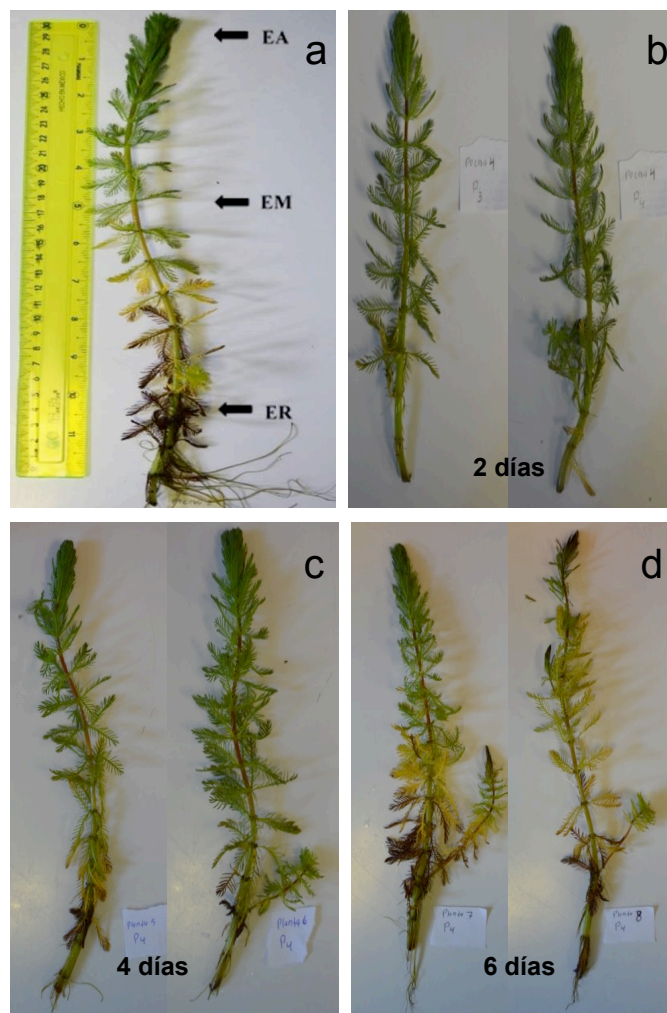
para evaluar el incremento obtenido como reflejo del crecimiento de las plantas, a través de la expresión:

$$\text{TC} = \frac{\text{Pff} - \text{Pfi} \times 100}{\text{Pfi}}$$

Donde: Pff = peso fresco final

Pfi = peso fresco inicial

Evaluación de la cantidad de fenoles totales en las plantas de *M. aquaticum*. Ainsworth y Gillespie (2007) mencionan que el ácido gálico (AG) es un compuesto simple considerado como estándar de comparación y expresión de resultados de fenoles totales. En este ensayo se empleó para la evaluación de éstos en las plantas de *M. aquaticum*. Se consideró su estrato medio (EM) como el sitio de mayor concentración reportada por Viveros-Legorreta (2016), caracterizado de acuerdo con el color de las hojas y posición en el tallo (Fig. 1a); los estratos están distribuidos en tercios de 10 cm de longitud denominados como: estrato apical (EA), estrato medio (EM) y estrato radical (ER). Se tomaron dos muestras foliares de cada planta y se determinó la concentración de AG



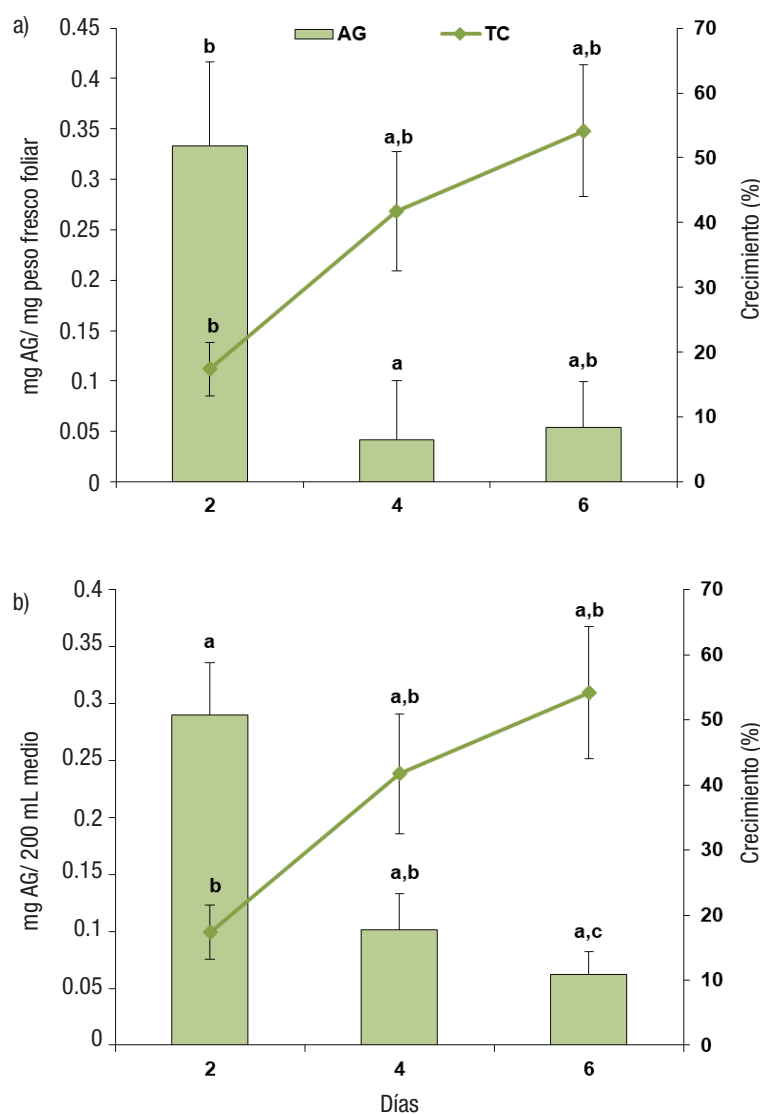
Figuras 1a-d. a) Distribución de los diferentes estratos establecidos para la evaluación de la producción de fenoles en *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.; b) Evidencia del crecimiento de las plantas de *M. aquaticum* en cultivo: 2 días; c) 4 días; d) 6 días. EA: Estrato Apical, EM: Estrato Medio, ER: Estrato Radical.

empleando el método del reactivo de Folin-Ciocalteu, según Sivaci *et al.* (2008), con el siguiente procedimiento: se molió el material vegetal con un homogeneizador de tejidos (Potter), donde se adicionaron 2.5 mL de etanol absoluto. Los tubos con los extractos foliares se dejaron en un baño de incubación a 25 °C por 24 h y después de ese tiempo se tomaron alícuotas de 1 mL de cada extracto, que se combinaron con 1 mL de etanol absoluto + 5 mL de agua destilada + 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%. Se mezclaron vigorosamente y después de 3 minutos se adicionaron 3 mL de una solución de Na₂CO₃ al 2%. Los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron por 1 hora a temperatura ambiente para el desarrollo del color azul característico de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de este tiempo, se leyó la absorbancia de cada mezcla a 760 nm en un espectrofotómetro. Los valores se interpolaron en una curva tipo de ácido gálico (0 a 5 mg/

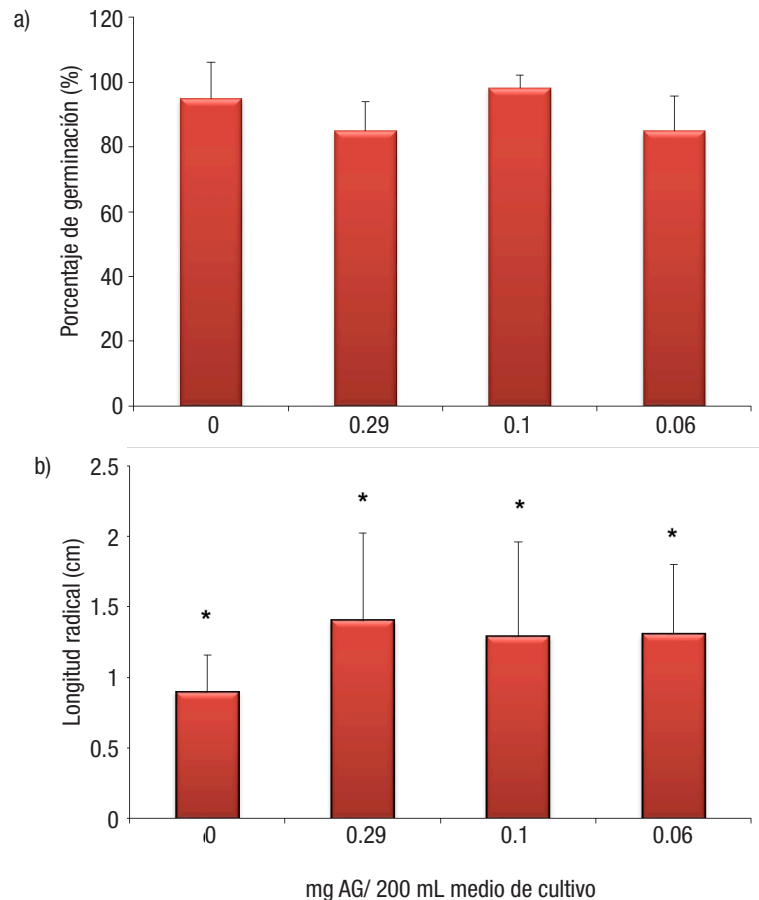
mL) y la cantidad de los compuestos fenólicos totales producidos por las plantas de *M. aquaticum* se reportaron como mg de AG/mg peso fresco foliar.

Evaluación de la liberación de fenoles de plantas de *M. aquaticum* al medio de cultivo.

La evaluación de la liberación de los fenoles de las plantas de *M. aquaticum* al medio de cultivo también se realizó por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu, según Sivaci *et al.* (2008), con las siguientes modificaciones al método citado: se tomaron alícuotas de 1 mL del medio de cultivo de cada tratamiento. Se añadió 1 mL de etanol absoluto + 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50%. Se mezclaron vigorosamente y después de 3 minutos se adicionaron 3 mL de una solución de Na₂CO₃ al 2%. Los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron por 24 h a temperatura ambiente para el desarrollo del color



Figuras 2a-b. Evaluación de los fenoles producidos y liberados al medio de cultivo y del crecimiento de las plantas de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. en los tiempos seleccionados. a) Tasa de crecimiento y producción de compuestos fenólicos producidos por las plantas; b) Tasa de crecimiento y compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo (n = 10, las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$)).



Figuras 3a-b. Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos (AG) producidos y liberados al medio de cultivo por las plantas de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. a) Porcentaje de germinación (n = 60, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$)); b) Longitud radical de *L. sativa* (n = 60, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$)).

azul característico de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de este tiempo, se leyó la absorbancia de cada mezcla a 760 nm en un espectrofotómetro que se interpoló también en una curva tipo de ácido gálico (0 a 5 mg/mL) y la cantidad de los compuestos fenólicos totales liberados al medio de cultivo por las plantas de *M. aquaticum* se expresó como mg de AG por 200 mL medio de cultivo, volumen considerado en el que se cultivaron las plantas.

Evaluación del efecto de los fenoles liberados por *M. aquaticum* sobre la germinación y desarrollo de plántulas de *Lactuca sativa*. El establecimiento del bioensayo con semillas de *Lactuca sativa* var. Butter Crunch (*Lactuca sativa* L. var. *secalina* (Alef.) Juckenack), se realizó con semillas comerciales certificadas de esta especie, que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% por tres minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se depositaron 12 semillas por placa de Petri que contenían papel filtro estéril. Los experimentos testigo solo con 0.7 mL de agua destilada estéril y alícuotas de 0.7 mL de los medios de cultivo de las plantas de *M. aquaticum* crecidas a los 2, 4 y 6 días, por quintuplicado. Las placas se incubaron a 36 °C por 72 h; transcurrido ese tiempo se determinó el porcentaje de germinación y la medición de la longitud radical. El efecto de los fenoles liberados al medio se observó a través de la evaluación de su fitotoksi-

cidad, empleando los índices del porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) y de elongación radical residual normalizado (IER) empleado por Pacheco-Hernández *et al.* (2015), propuesto por Bagur-González *et al.* (2011):

$$\text{IGN} = \frac{\text{Germcult} - \text{Germtest}}{\text{Germtest}}$$

Donde Germcult es el porcentaje promedio de las semillas germinadas con las alícuotas de los medios de cultivo colectados a los 2, 4 y 6 días de crecimiento de las plantas de *M. aquaticum*; mientras que Germtest es el porcentaje promedio de semillas germinadas en agua destilada (testigo).

$$\text{IER} = \frac{\text{Elongcult} - \text{Elongtest}}{\text{Elongtest}}$$

Donde Elongcult es la longitud promedio de las radículas de las semillas germinadas con las alícuotas de los medios de cultivo colectados a los 2, 4 y 6 días de crecimiento de las plantas de *M. aquaticum*, y Elongtest es la longitud promedio de las radículas de las semillas germinadas en el agua destilada (testigo).

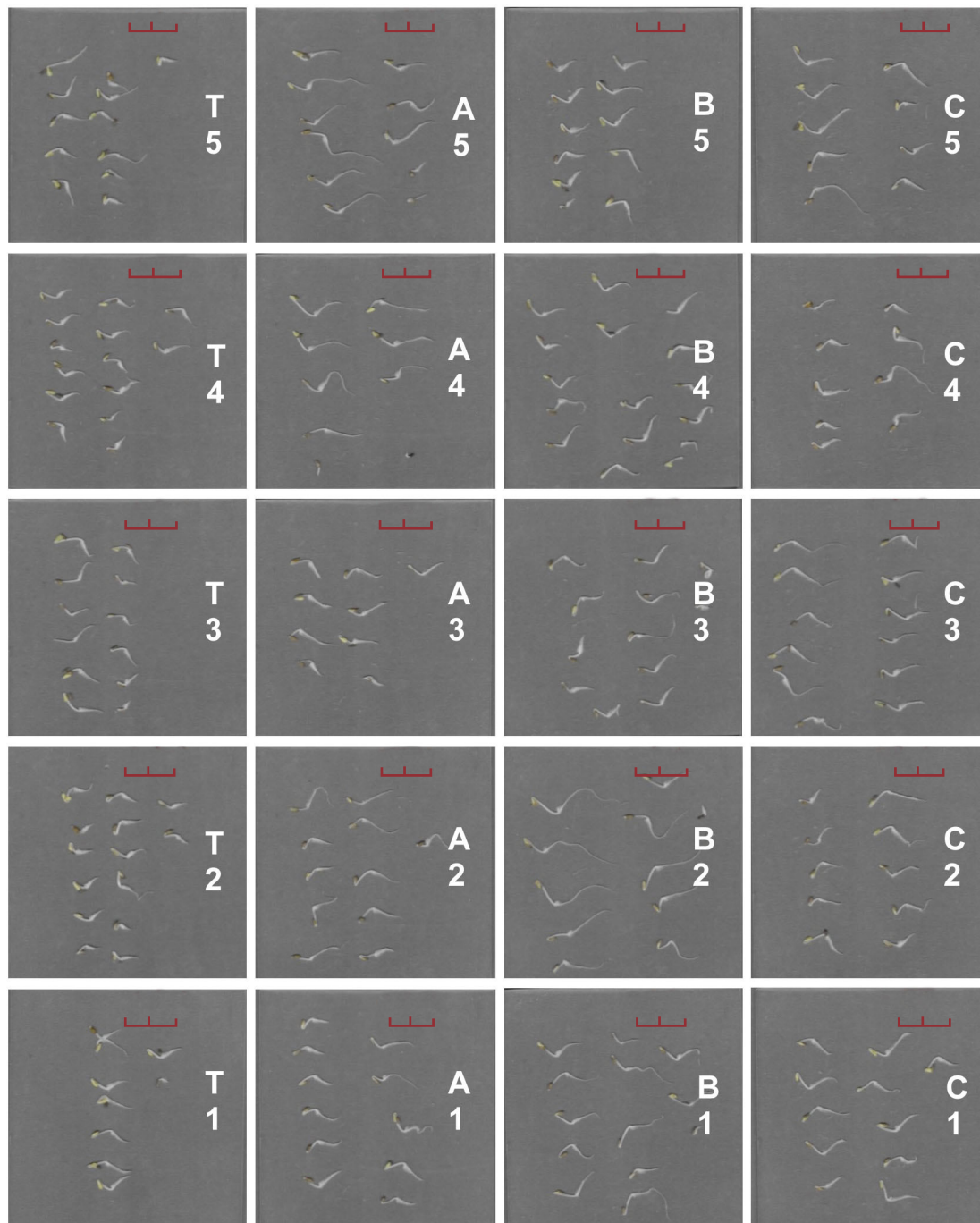


Figura 4. Evidencia del efecto de hormesis producido por los compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo, sobre la elongación radical de plántulas de *Lactuca sativa* L. T: Testigo; A: 0.29 mg AG/200 mL; B: 0.10 mg AG/200 mL; C: 0.06 mg AG/200 mL.

Estos índices, según Pacheco-Hernández *et al.* (2015), son herramientas que permiten analizar el efecto fitotóxico de compuestos liberados que inhiben o promueven el desarrollo y, de acuerdo con el índice reportado por Bagur-González *et al.* (2011), con valores de toxicidad que van desde -1 a > 0 , con las siguientes categorías propuestas: A =

de 0 a -0.25 baja toxicidad, B = de -0.25 a -0.5 toxicidad moderada, C = de -0.5 a -0.75 alta toxicidad y D = de -0.75 a -1.0 , toxicidad muy alta. Estos autores establecen también que los valores del índice > 0 indican que se dio la estimulación del crecimiento de la radícula conocido como hormesis.

Análisis de datos. Todos los datos obtenidos se evaluaron con un análisis de varianza de una vía y se compararon las medias obtenidas a través de una prueba de Tukey-Kramer, empleando el programa estadístico Graph Pad Instat Ver. 2.03.

RESULTADOS

En los tratamientos establecidos para evaluar el crecimiento y producción de fenoles por las plantas de *M. aquaticum* se observó la promoción de la longitud de las plantas (Fig. 1), con un incremento en las tasas de crecimiento de la biomasa obtenida (%): 17.40 ± 4.13 , 41.73 ± 9.2 y 54.17 ± 10.1 a los 2, 4 y 6 días, respectivamente, con diferencias significativas ($p < 0.001$). La producción de fenoles presentó el mismo patrón entre la concentración medida en el estrato medio de las plantas: 0.33 ± 0.08 , 0.04 ± 0.05 y 0.05 ± 0.04 mg AG/ mg peso fresco foliar, y la cantidad de fenoles liberados al medio de cultivo: 0.29 ± 0.04 , 0.10 ± 0.03 y 0.06 ± 0.02 mg AG/200mL medio de cultivo, a los 2, 4 y 6 días, respectivamente (Figs. 2a y 2b), con diferencias significativas ($p \leq 0.01$) durante los 6 días del crecimiento de las plantas.

La figura 3a muestra los resultados de la evaluación del porcentaje de germinación, donde las concentraciones de AG cuantificado en el medio de cultivo no inhibieron la germinación de las semillas de *L. sativa* en comparación con las semillas germinadas en condiciones normales (testigo: $95 \pm 11.1\%$). Se obtuvieron los valores de 84.9 ± 9.09 , 98.32 ± 3.7 y $84.98 \pm 10.8\%$, respectivamente, en las concentraciones de 0.29, 0.10 y 0.06 mg de AG, pero se observa un efecto contrastante sobre la elongación radical que evidenció el efecto promotor de éstas

sobre las plántulas de *L. sativa* con un incremento del 57, 43 y 46% en la longitud radical ante la exposición a las concentraciones de AG probadas (0.29, 0.10 y 0.06 mg AG), comparadas con las plántulas testigo.

DISCUSIÓN

La producción y liberación de fenoles de las macrófitas que incluyen a *M. aquaticum* han sido estudiadas por diferentes autores (Gross *et al.*, 1996; Nakai *et al.*, 1999). En particular, Hilt *et al.* (2006) reportan que en la zona apical de las especies del género *Myriophyllum* se produce una alta cantidad de fenoles. En este estudio, la evaluación de la producción de compuestos fenólicos evidenció una relación directa entre esta especie y su comportamiento bajo cultivo, producto de la plasticidad genética reflejada en su heterofilia. Esto produjo la aceleración en el proceso de liberación de fenoles durante los primeros días de desarrollo, lo que coincide con lo reportado por Lindén y Lehtiniemi (2005), quienes observaron que con el manejo de esquejes de *M. spicatum* se dio la liberación de una alta concentración de fenoles bajo condiciones de laboratorio. Es importante notar que la heterofilia de *M. aquaticum* la sugiere como una especie con un impacto significativo de sensibilidad en bioensayos que emplean esta macrófita acuática; de igual manera, el hecho de que las altas tasas de crecimiento de los tallos de las macrófitas anfíbias cuando se encuentran sumergidas son resultado de la acción primaria de procesos regulados por fitohormonas endógenas, y solo en parte resultado de la asimilación del carbono vía fotosíntesis, como lo reportan Ebke *et al.* (2013).

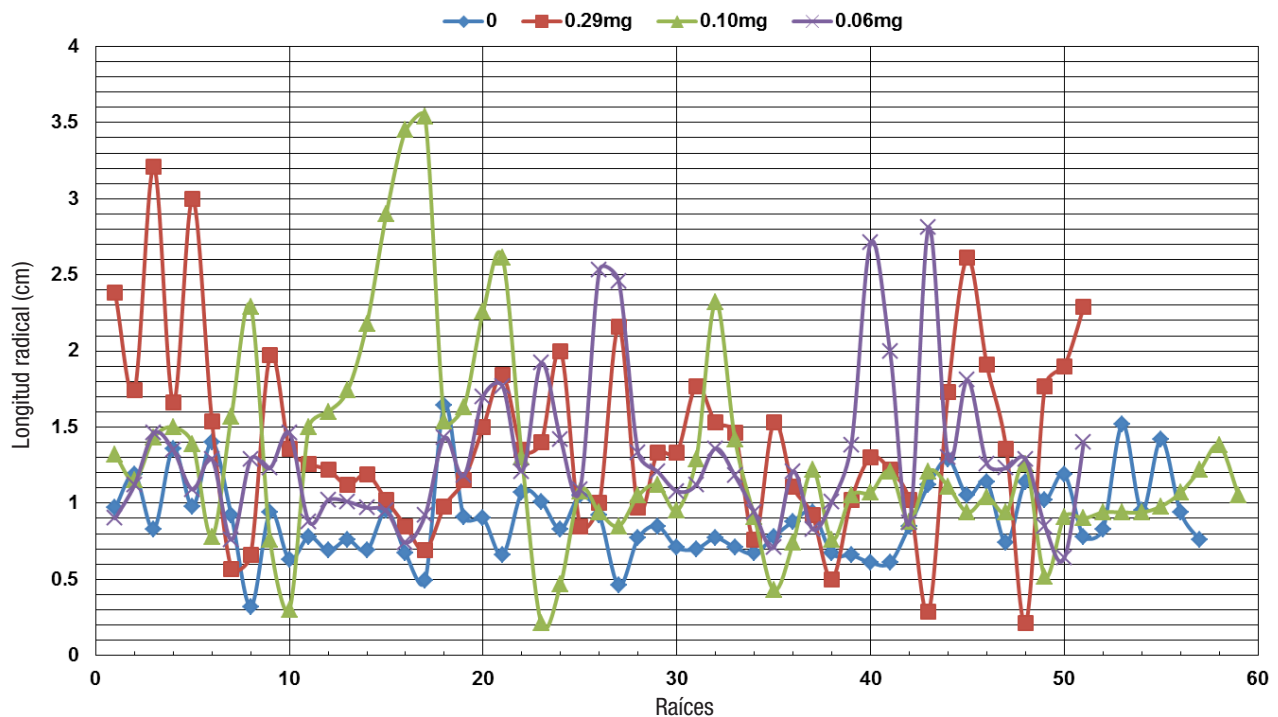


Figura 5. Comportamiento radical de las plántulas de *Lactuca sativa* L. producido por los compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo por *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc.

En cuanto a la evaluación del efecto de los compuestos fenólicos liberados por *M. aquaticum* sobre *L. sativa*, la comparación de los índices IGN y IER obtenidos a partir de las mediciones del porcentaje de germinación y la longitud radical de las plántulas de *L. sativa* indican que el efecto de las alícuotas probadas de los medios de cultivo que contenían las diferentes concentraciones de AG liberados por las plantas de *M. aquaticum* sobre la germinación de las semillas, tuvieron un efecto de baja toxicidad, en concentraciones de 0.29 y 0.06 mg AG (IGN, A = -0.10), con un ligero efecto sobre la germinación de las semillas expuestas a la concentración de 0.10 mg AG cuantificado en el medio de cultivo de IGN, E= 0.03, según la escala propuesta por Bagur-González *et al.* (2011). En este estudio, el índice que mostró más sensibilidad fue el IER, donde, no obstante que no se presentó un efecto fitotóxico de los fenoles presentes en el medio de cultivo de las muestras analizadas, sí se observó un efecto promotor sobre la elongación, según éste índice, con valores de E = 0.56, 0.43 y 0.45, bajo las concentraciones de 0.29, 0.10 y 0.06 mg AG respectivamente, comparadas con las plántulas testigo. Estos resultados se observan en la figura 4, donde se muestra la apariencia de las plántulas de *L. sativa* bajo las condiciones establecidas en el bioensayo; pero no se notan cambios visibles en las raíces que muestren daño al compararse con las plántulas testigo. La figura 5 muestra el comportamiento de las raíces de cada plántula de *L. sativa* expuestas a las diferentes concentraciones de AG cuantificado en relación con su longitud radical total, donde muestran variaciones muy similares en el crecimiento de las raíces de las plántulas desarrolladas bajo condición normal (testigo) y las expuestas a 0.10 y 0.06 mg AG, pero con mayor longitud radical obtenida en las plántulas expuestas a 0.29 mg AG. Esta respuesta resultó similar a la reportada por Ngoc-Bich y Kato-Noguchi (2012), quienes obtuvieron una relación de dosis-respuesta en el crecimiento radical de *Echinochloa crus-galli* (Linnaeus) P. Beauv., *Lolium multiflorum* Lamarck, *Medicago sativa* Linnaeus y *Lepidium sativum* Linnaeus, expuestas a extractos de *Centrostachys aquatica* (R. Br.) Baill., *Polygonum pulchrum* Blume, *Hymenachne acutigluma* Steud y de *Ischaemum hirtum* Hack. Éstas reflejaron una respuesta de hormesis, fenómeno que es muy reconocido en estudios de fitotoxicidad en plantas; cuando ocurre se promueve su crecimiento a altas concentraciones al inicio de su desarrollo (Randhawa *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Belz y Hurlle, 2004; Ahmed *et al.*, 2007; Belz, 2008).

Einhelling y Rasmussen (1978) y Williams y Harland (1982) han reportado efectos aditivos o sinérgicos de diferentes compuestos fenólicos en las interacciones alelopáticas aun en bajas concentraciones. Quayyum *et al.* (1999) analizaron el efecto de extractos fenólicos acuosos de *Myriophyllum verticillatum* Linnaeus (200 mg/100 g peso fresco) sobre la germinación y desarrollo radical de *L. sativa*, con el 75% de la inhibición en su longitud radical.

En este trabajo, la respuesta obtenida con la aplicación de las alícuotas de los medios de cultivo de las plantas de *M. aquaticum* que contenían los fenoles liberados por éstas no resultó fitotóxica; por el contrario, favoreció la elongación radical en términos de la relación dosis-respuesta: E: 0.56, 0.43 y 0.45, para las concentraciones de AG de 0.29, 0.10 y 0.06 mg AG, respectivamente.

Pacheco-Hernández *et al.* (2015) mencionan que la medición de la elongación radical es un parámetro fisiológico importante para la evaluación de la toxicidad de compuestos, ya que durante los primeros días de desarrollo de las plántulas la presencia de una sustancia

tóxica puede interferir en su fisiología, como lo reportan también Prati y Bossdorf (2004); Kadioglu *et al.* (2005) y Sobrero y Ronco (2008). Asimismo, la inhibición o promoción del crecimiento radical se considera como un buen sensor de la respuesta de las plántulas a compuestos activos que bien pueden tratarse de compuestos aleloquímicos (Pellisier, 2013). Por lo tanto, es necesario distinguir entre alelopatía y fitotoxicidad, como mencionan Ellakovich y Yang (1996); ya que no todos los compuestos fitotóxicos son aleloquímicos, aunque algunos aleloquímicos requieren ser fitotóxicos y, en consecuencia, emplear el tipo de bioensayos manejado en este estudio resulta útil para determinar aquellos compuestos activos que no necesariamente demuestran su comportamiento alelopático.

Es importante mencionar también que los biomarcadores de plantas ofrecen ventajas al evaluarse como *endpoints*. Arts *et al.* (2008) mencionan que un *endpoint* se define como una variable que refleja el desarrollo de un organismo prueba durante y después de su exposición a un compuesto tóxico; además de que los criterios de selección que deben tomarse en cuenta son los de relevancia ecológica y sensibilidad toxicológica, expresados como valores de toxicidad y de varianza. La sensibilidad de los *endpoints* y la varianza alrededor de los niveles de los experimentos testigo no son consideradas como variables independientes, dado que la varianza influye en las desviaciones de las concentraciones más altas a partir de los testigos y, con ello, en la sensibilidad. Por esta razón, la sensibilidad es el criterio más importante; mientras que en el caso de sensibilidades similares, la varianza puede emplearse como un segundo criterio. La selección de los *endpoints* solamente con base en los coeficientes de variación, sin considerar la sensibilidad, como lo han propuesto Knauer *et al.* (2006), pueden dar como resultado *endpoints* que no son en su mayoría sensibles toxicológicamente hablando. Hanson *et al.* (2003) evaluaron *endpoints* comparando la sensibilidad toxicológica, el poder estadístico y la relevancia ecológica, con lo que recomiendan el empleo de los *endpoints* radicales como indicadores de toxicidad. Schmidt y Redshaw (2015) consideran que la evaluación de la longitud radical o la elongación radical es uno de los *endpoints* más comunes que se emplean o aplican a los estudios de fitotoxicidad, y que los *endpoints* específicos de la longitud radical y del brote están en función de la longitud y biomasa de las plántulas. De nueva cuenta, se reporta que los efectos más evidentes que producen los compuestos tóxicos sobre las plantas son la inhibición de la germinación (Espen *et al.*, 1997; Mishra & Choudhuri, 1998) y la inhibición en el crecimiento radical (Tiqua *et al.*, 1996). Por esta razón, la tasa de germinación y de elongación radical de las plantas terrestres vasculares se ha empleado con mayor frecuencia en ensayos de fitotoxicidad para evaluar los efectos de compuestos orgánicos e inorgánicos (Reynolds, 1989; Wang y Keturi, 1990; Wang y Williams, 1990; Baudgrasset *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1999; Sharifi *et al.*, 2007; Valerio *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Koči *et al.*, 2010).

Finalmente, como conclusiones de este estudio, el desarrollo de plantas acuáticas con patrones de plasticidad genética tan particulares como el que tiene *M. aquaticum* de la heterofilia, permite entender cómo este tipo de plantas anfibas se adapta a diferentes cambios en su hábitat, lo que le permite mantenerse en él o incluso colonizar otros sitios. Además de sus adaptaciones químico-ecológicas a través de la producción localizada de compuestos fenólicos en las plantas, bajo condiciones sumergidas, que a través de la aplicación de bioensayos con la evaluación de *endpoints* de germinación y radicales mostraron el efecto manifiesto de los compuestos fenólicos liberados por las plantas

sumergidas de *Myriophyllum aquaticum* en el desarrollo temprano de plántulas de *Lactuca sativa*, caracterizados como compuestos bioactivos, al evidenciar su toxicidad baja o nula, de acuerdo con la relación dosis-respuesta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero otorgado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional al Proyecto de Investigación SIP: 20151927, para la realización de este trabajo y también a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA, IPN), EDI (Estímulo al Desempeño de los Investigadores, IPN) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACyT).

REFERENCIAS

- AHMED, R., M. B. UDDIN, M. A. S. A. KHAN, S. A. MUKUL & M. K. HOSSAIN. 2007. Allelopathic effects of *Lantana camara* on germination and growth behavior of some agricultural crops in Bangladesh. *Journal of Forest Research* 18: 301-304. DOI:10.1007/s11676-007-0060-6
- AINSWORTH, E. A. & K. M. GILLESPIE. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2: 875-877. DOI:10.1038/nprot.2007.102
- ARRIAGA, L., C. AGUILAR, D. ESPINOSA & R. JIMÉNEZ. 1997. Regionalización ecológica y biogeográfica de México. Taller de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D.F.
- ARTS, H. P., J. DICK, M. BELGERS, C. H. HOEKZEMA & J. T. N. M. THISEN. 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental Pollution* 153: 199-206. DOI:10.1016/j.envpol.2007.07.019
- BAGUR-GONZÁLEZ, M. G., C. ESTEPA-MOLINA, F. MARTÍN-PEINADO & S. MORALES-RUANO. 2011. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments* 11: 281-289. DOI:10.1007/s11368-010-0285-4
- BAUDGRASSET, F., S. BAUDGRASSET & S. I. SAFFERMAN. 1993. Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere* 26:1365-1374. DOI:10.1016/0045-6535(93)90187-A
- BELZ, R. G. & K. J. HURLE. 2004. A novel laboratory screening bioassay for crop seedling allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 30: 175-198. DOI:10.1023/B:JOEC.0000013190.72062.3d
- BELZ, R. G. 2008. Stimulation versus inhibition-bioactivity of parthenin, a phytochemical from *Parthenium hysterophorus* L. *Dose Response* 6: 80-96. DOI:10.2203/dose-response.07-007.Belz
- CALLAWAY, R. & W. RIDENOUR. 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and Environment* 2: 436-443. DOI:10.1890/1540-9295(2004)002[0436:NIWISAT]2.0.CO;2
- CHEN, C., Q. ZHOU, Y. BAO, Y. LI & P. WANG. 2010. Ecotoxicological effects of polycyclic musks and cadmium on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Environmental Sciences* 22: 1966-1973. DOI:10.1016/S1001-0742(09)60347-8
- D'ABROSCA, B., M. DELLA GRECA, A. FIORENTINO, M. ISIDORI, P. MONACO & S. PACIFICICO. 2006. Chemical constituents of the aquatic plant *Schoenoplectus lacustris*: evaluation of phytotoxic effects on the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Journal of Chemical Ecology* 32:81-96. DOI:10.1007/s10886-006-9354-y
- DI SALVATORE, M., A. M. CARAFA & G. CARRATÙ. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity next term using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73: 1461-1464. DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.07.061
- EBKE, K.P., C. FELTEN & L. DÖREN. 2013. Impact of heterophylly on the sensitivity of *Myriophyllum aquaticum* biotests. *Environmental Sciences Europe* 25:1-9. DOI:10.1186/2190-4715-25-6
- EINHELLING, F. A. & J. A. RASMUSSEN. 1978. Synergistic inhibitory effects of vanillic and p-hydrobenzoic acids on radish and grain sorghum. *Journal of Chemical Ecology* 4: 425-436. DOI:10.1007/BF00989499
- ELAKOVICH, S. D. & J. W. WOOTEN. 1989. Allelopathic potential of sixteen aquatic and wetland plants. *Journal of Aquatic Plant Management* 27: 78-84.
- ELAKOVICH, S. D. & J. YANG. 1996. Structures and allelopathic effects of *Nuphar* alkaloids: nupharolutine and 6,6c-dihydroxythiobinupharidine. *Journal of Chemical Ecology* 22: 2209-2219. DOI:10.1007/BF02029541
- ERHARD, D. & E. M. GROSS. 2006. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *E. nuttallii* against epiphytes and phytoplankton. *Aquatic Botany* 85: 203-211. DOI:10.1016/j.aquabot.2006.04.002
- ESPEN, L., L. PIROVANO & S. M. COCUCCI. 1997. Effect of Ni²⁺ during the early phases of radish (*Raphanus sativus*) seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 38:187-197. DOI:10.1016/S0098-8472(97)00011-7
- FLETCHER, J. S., F. L. JOHNSON & J. C. MCFALANE. 1988. Database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7: 615-622. DOI:10.1002/etc.5620070803
- FLETCHER, R. & A. RENNEY. 1963. A growth inhibitor found in *Centaurea* spp. *Canadian Journal of Plant Sciences* 43:475-481. DOI:10.4141/cjps63-098
- GODFREY, R. K. & J. W. WOOTEN. 1981. Aquatic and Wetland Plants of Southeastern United States: Dicotyledons. Vol. 2. University of Georgia Press, Athens, GA, USA.
- GONG, P., B. M. WILKE & S. FLEISCHMANN. 1999. Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36:152-157. DOI:10.1007/s002449900455
- GOPAL, B. & U. GOEL. 1993. Competition and allelopathy in aquatic plant communities. *Botanical Reviews* 59: 155-210. DOI:10.1007/BF02856599
- GROSS, E. M., H. MEYER & G. SCHILLING. 1996. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry* 41: 133-138. DOI:10.1016/0031-9422(95)00598-6
- GROSS, E. M. 1999. Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submersed macrophytes. In: (Inderjit, K.M., M. Dakshini & C. L. Foy (Eds.). *Prin-*

- Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 179-199.
- GROSS, E. M., D. ERHARD & E. IVÁNYI. 2003. Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp. *intermedia* (Wolfgang) Casper. *Hydrobiologia* 506: 583-589. DOI:10.1023/B:HYDR.0000008539.32622.91
- GROSS, E. M., S. HILT, P. LOMBARDO & G. MULDERIJ. 2007. Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton-state of the art and open questions. *Hydrobiologia* 584: 77-88. DOI:10.1007/s10750-007-0591-z
- HANSON, M. L., H. SANDERSON, K. R. SOLOMON. 2003. Variation, replication, and power analysis of *Myriophyllum* spp. microcosm toxicity data. *Environmental and Toxicology Chemistry* 22: 1318-1329. DOI:10.1002/etc.5620220619
- HERNÁNDEZ, G. O. U. 2013. Prospección ecológica de la Laguna de Salazar, Estado de México (Tesis de Investigación). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.
- HILT, S. 2006. Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes. *Aquatic Botany* 85: 252-256. DOI:10.1016/j.aquabot.2006.05.004
- HUTCHINSON, G. E. 1975. *A Treatise on limnology Vol. III. Limnological botany*. John Wiley & Sons, New York. 660 p.
- KADIOGLU, I., Y. YANAR & U. ASAV. 2005. Allelopathic effects of weeds extracts against seed germination of some plants. *Journal of Environmental Biology* 26:169-173.
- KANE, M. E., E. F. GILMAN & M. A. JENKS. 1991. Regenerative capacity of *Myriophyllum aquaticum* tissues cultured *in vitro*. *Journal of Aquatic Plant Management* 29: 102-109.
- KNAUER, K., M. VERVLIIET-SCHNEEBaum, R. J. DARK & S. J. MAUND. 2006. Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants. *Pest Management Science* 62: 715-722. DOI:10.1002/ps.1226
- KOČÍ, V., K. MOCOvÁ, M. KULOvANÁ & S. VOŠAHLovÁ. 2010. Phytotoxicity tests of solid wastes and contaminated soils in the Czech Republic. *Environmental Science and Pollution Research* 17: 611-623. DOI:10.1007/s11356-009-0214-5
- LINDÉN, E. & M. LEHTINIEMI. 2005. The lethal and sublethal effects of the aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum* on Baltic littoral planktivores. *Limnology and Oceanography* 50: 405-411. DOI:10.4319/lo.2005.50.2.0405
- LING, T., Y. FANGKE & R. JUN. 2010. Effect of mercury to seed germination, coleoptile growth and root elongation of four vegetables. *Research Journal of Phytochemistry* 4: 225-233. DOI:10.3923/rjphyto.2010.225.233
- LIU, D. L., M. AN, I. R. JOHNSON & J. V. LOVETT. 2003. Mathematical modeling of allelopathy. III. A model for curve-fitting allelochemical dose responses. *Nonlinearity in Biology Toxicology and Medicine Journal* 1: 37-50. DOI:10.1080/15401420390844456
- MACÍAS, F. A., L. G. J. GALINDO, M. D. GARCÍA-DÍAZ & J. C. G. GALINDO. 2008. Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models. *Phytochemistry Reviews* 7:155-178. DOI:10.1007/s11101-007-9065-1
- MASON, H. L. 1957. *A Flora of the Marshes of California*. University of California Press, Berkeley, CA, USA.
- MISHRA, A. & M. A. CHOUDHURI. 1998. Ameliorant of lead and mercury effect on germination and rice seedling growth by antioxidants. *Biologia Plantarum* 41:469-473. DOI:10.1023/A:1001871015773
- MORRIS, C., P. R. GROSS & C. A. CALL. 2009. Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls. *Plant Ecology* 202:1-11. DOI:10.1007/s11258-008-9470-6
- MULDERIJ, G., B. MAU, E. VAN DONK & E. M. GROSS. 2007. Allelopathic activity of *Stratiotes aloides* on phytoplankton towards identification of allelopathic substances. *Hydrobiologia* 584: 89-100. DOI:10.1007/s10750-007-0602-0
- NAKAI, S., Y. INOUE, M. HOSOMI & A. MURAKAMI. 1999. Growth inhibition of blue green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Science and Technology* 39: 47-53.
- NAKAI, S., Y. INOUE, M. HOSOMI & A. MURAKAMI. 2000. *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 34: 3026-3032. DOI:10.1016/S0043-1354(00)00039-7
- NAKAI, S., S. YAMANE & M. HOSOMI. 2001. Algal growth inhibition effects of *Myriophyllum spicatum*-releasing four allelopathic phenols. *Journal of Japan Society of Water Environment* 23:726-730. DOI:10.2965/jswe.23.726
- NASIR, H., Z. IQBAL, S. HIRADATE & Y. FUJII. 2005. Allelopathic potential of *Robinia pseudoacacia* L. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2179-2192. DOI:10.1007/s10886-005-6084-5
- NGOC-BICH, T. T. & H. KATO-NOGUCHI. 2012. Allelopathic potential of four emergent macrophytes on the growth of terrestrial plant species. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* 4: 81-94.
- PACHECO-HERNÁNDEZ, X. J., A. RODRÍGUEZ-DORANTES, R. GONZÁLEZ-RIVERA, E. AMORA-LAZCANO, L. A. GUERRERO-ZUÑIGA & A. V. RODRÍGUEZ-TOVAR. 2015. Evaluación del efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench). *Polibotánica* 40: 137-152. DOI:10.18387/polibotanica.40.9
- PELLISSIER, F. 2013. Improved germination bioassays for allelopathy research. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 23-30. DOI:10.1007/s11738-012-1044-5
- PRATI, D. & O. BOSSDORF. 2004. Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 91: 285-288. DOI:10.3732/ajb.91.2.285
- QUAYYUM, H. A., A. U. MALLIK, D. E. ORR & P. F. LEE. 1999. Allelopathic potential of aquatic plants associated with wild rice: II. Isolation and identification of allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 25: 221-228. DOI:10.1023/A:1020805704172
- RANDHAWA, M. A., Z. A. CHEEMA & M. A. ALI. 2002. Allelopathic effect of sorghum water extract on the germination and seedling growth of *Trianthema portulacastrum*. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 383-384.

- REYNOLDS, T. 1989. Comparative effects of heterocyclic compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *Journal of Experimental Botany* 40: 391-404. DOI:10.1093/jxb/40.3.391
- SCHMIDT, W. & C. H. REDSHAW. 2015. Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 112: 212-222. DOI:10.1016/j.ecoenv.2014.11.008
- SEDUR (SECRETARÍA DE DESARROLLO URBANO). 2010. Plan Municipal de Desarrollo Urbano de Lerma. H. Ayuntamiento de Lerma. Estado de México. 248 p.
- SHARIFI, M., Y. SADEGHI & M. AKBARPOUR. 2007. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. *International Journal of Environmental Science & Technology* 4: 463-470. DOI:10.1007/BF03325982
- SIVACI, A., E. ELMAS, F. GÜMÜŞ & E. R. SIVACI. 2008. Removal of cadmium by *Myriophyllum heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. and its effect on pigments and total phenolic compounds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 612-618. DOI:10.1007/s00244-007-9070-9
- SOBRERO, M. C. & A. RONCO. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In: Ramírez Romero P. y A. Mendoza Cantú A. (Compiladoras). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, pp. 55-68.
- SUTTON, D. L. & S. W. BINGHAM. 1973. Anatomy of emerged parrot feather. *Hyacinth Control Journal* 11: 49-54.
- TIQUA, S. M., N. F. Y. TAM & I. J. HODGKISS. 1996. Effect of composting on phytotoxicity of spent pigmanure sawdust litter. *Environmental Pollution* 93: 249-256. DOI:10.1016/S0269-7491(96)00052-8
- VALERIO, M. E., J. F. GARCÍA & F. M. PEINADO. 2007. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a biomass with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Science of the Total Environment* 378: 63-66.
- VISIOLI, G., F. D. CONTI, C. GARDI & C. MENTA. 2014. Germination and root elongation bioassays in six different plant species for testing Ni contamination in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92: 490-496. DOI:10.1007/s00128-013-1166-5
- VIVEROS-LEGORRETA J. L. 2016. Evaluación de la producción de fenoles de *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc., 1973 bajo condiciones de laboratorio y su efecto en la supervivencia de *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Cladocera). Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.
- WANG, W. & P. H. KETURI. 1990. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of metals engraving effluent sample. *Water Air and Soil Pollution* 52: 369-376. DOI:10.1007/BF00229444
- WANG, W. & J. M. WILLIAMS. 1990. The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment* 14: 45-58. DOI:10.1007/BF00394356
- WEBER, C. I. 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency. Fifth Edition, 275 p.
- WERSAL, R. M. & J. D. MADSEN. 2011. Influences of water column nutrient loading on growth characteristics of the invasive aquatic macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. *Hydrobiologia* 665: 93-105. DOI:10.1007/s10750-011-0607-6
- WILLIAMS, R. D. & R. E. HARLAND. 1982. The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Science* 30: 206-212.