

ALELOPATÍA Y SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Efecto del extracto acuoso de *Ipomoea batatas* sobre la actividad de las oxidasas de la auxina y la permeabilidad celular en plántulas de frijol

Effect of *Ipomoea batatas* aqueous extract on the activity of auxin oxidases and cellular permeability in bean seedling

Johanna Cruz-Tovar, Maykel Hernández-Aro, Sinesio Torres-García.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Cuba. CP: 54830.

E-mail: crztyr@yahoo.com; Johanna@uclv.edu.cu

RESUMEN. El trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto del extracto acuoso de *Ipomoea batatas* (L). Lam sobre la actividad de las Oxidasas del AIA y la permeabilidad celular de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Wacute. El follaje (tallos y hojas) de *I. batatas* (Clon CEMSA 78-354) se secó en estufa, se molió finamente y se obtuvo el extracto acuoso. En el primer experimento se sembraron semillas de frijol en bandejas usando suelo como sustrato. A los 30 días, las plántulas se pusieron en contacto con el extracto acuoso *I. batatas* por dos horas y luego se procedió a determinar la actividad de las Oxidasas del AIA. En el segundo experimento se sembraron 25 semillas de frijol en bandejas de poliestireno, con sustrato zeolita. A los 15 días se colocaron las plantas en contacto con el extracto de *I. batatas* por una hora y a continuación se determinó la permeabilidad celular de las plántulas. Se demostró que el extracto de *I. batatas* no afectó la actividad del complejo de enzimas oxidásicas de la auxina. Se comprobó que el extracto de boniato provocó un mayor valor de conductividad eléctrica del agua, en la medida que las plantas tratadas con extracto estuvieron más tiempo colocadas en agua desionizada, comparada con las plantas control. Esto evidencia un aumento de la permeabilidad celular y posibles trastornos en los transportadores iónicos de las membranas, dado por la actividad de aleloquímicos presentes en el extracto acuoso de boniato.

Palabrac clave: Alelopatía, extracto acuoso, *Ipomoea batatas*, oxidasas del AIA, permeabilidad celular.

ABSTRACT. The work was carried out with the objective to determine the effect of aqueous extract of *Ipomoea batatas* (L). Lam. on the activity of AIA-oxidase and cellular permeability of *Phaseolus vulgaris* L. var. Wacute seedling. Foliage (leaves and stems) of *I. batatas* (Clon CEMSA 78-354), was dried in oven at 70 °C till constant weight, milled thinly then was carried out the water extraction from *Ipomoea batatas* (L). Lam. The first experiment consisted in sowing beans seeds in trays, using soil as a substrate. Thirty days later the seeds were placed in the water extract of *I. batatas* for two hours, then was proceeded to determine the activity of enzymes of AIA- Oxidase. In the second experiment twenty five beans seeds were sowed in polyesthylene trays, with the zeolites stones grounded as substrate. Fifteen days later the plants were placed in contact with the water extract for an hour and was proceeded the determination of cellular permeability of *P. vulgaris*. It was shown that the extract of *I. batatas* didn't affect the activity of the complex of IAA-oxidase. It was proved that the extract of sweet potatoes caused a major value of electric conductivity of deionized water that those who did not were treated with the extract. This makes evident an increase of cellular permeability and the possible overturning in ions transporters in the membranes, given to the activity of allelochemicals present in the extract of sweet potato.

Keywords: Allelopathy, water extract, *Ipomoea batatas*, AIA-oxidase, cellular permeability.

INTRODUCCIÓN

Se han reportado varios efectos alelopáticos de los residuos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Boniato) sobre diferentes cultivos (Walker *et al.*, 1989). Torres *et al.* (2003) demostraron que los restos de *I. batatas* tenían un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento del frijol y también de malezas como:

Amaranthus sp. (bledo), *Portulaca oleracea* L. (verdolaga), *Echinocloa colona* (L.) Link. (metebravo) y *Euphorbia heterophylla* L. (hierba lechosa). Sin embargo estimularon el crecimiento del melón, calabaza, pepino, maíz y rábano. Hernández (2007) al probar los residuos de hojas

y tallos de *I. batatas* (Clon CEMSA 78-354) sobre malezas y cultivos comprobó que el tratamiento con los mismos producía un efecto inhibitorio dependiente de la concentración y la especie receptora. En Cuba se siembran cerca de 400 mil hectáreas de boniato, con una alta representatividad del clon CEMSA 78-354. Esta variedad puede resultar muy beneficiosa por sus efectos alelopáticos sobre otros cultivos y para el control de algunas malezas. Sin embargo, a pesar de su utilidad, se desaprovecha su aplicación en la producción agrícola. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar el efecto del extracto acuoso de *I. batatas* sobre la actividad de las oxidasas del AIA y la permeabilidad celular de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Wacute,

MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de los restos *I. batatas* se realizó al azar en forma diagonal en el Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT), Se colectaron hojas y tallos de la variedad CEMSA 78-354 en el período de cosecha del cultivo. El material vegetal una vez troceado se introdujo en la estufa (Memmert modell 100) a 70°C por un período de 72 horas. Una vez seco se molió en un molino de martillo (Veb Nosser 8225 Nossen), con un tamiz acoplado de 1 mm de diámetro. Siguiendo el método descrito por An *et al.*, (1997), se remojó el pulverizado en agua destilada a 80°C por 15 minutos, a razón de 1:30 (p/v) y 1: 15 (p/v). La mezcla se filtró por gasa doble y luego con papel del filtro (Watman 40), obteniéndose el extracto acuoso de boniato empleado en los diferentes bioensayos.

Para conocer el efecto causado por el extracto acuoso de *I. batatas* sobre la actividad de las oxidasas de la auxina en *Phaseolus vulgaris*, se sembraron en bandejas semillas de frijol sobre suelo Pardo Sialítico Medianamente Lavado (Hernández *et al.*, 1999). A los 30 días se extrajeron del suelo las plantas y se lavaron bajo agua corriente por cinco minutos. Se colocaron dos plantas por tubo de ensayo (en total cinco tubos de ensayo), conteniendo cada uno, 20 mL de extracto acuoso de *I. batatas* preparado según An *et al.*, (1997). Las plantas permanecieron por dos horas expuestas al

extracto. Luego se lavaron por cinco minutos en agua corriente y se procedió a determinar la actividad de las enzimas AIA-Oxidasas.

-Extracción de proteínas: Se tomaron dos gramos de tejido radicular de las plantas tratadas con extracto y otras tratadas con agua destilada, como control. Se tomaron ocho muestras de cada tratamiento y se maceraron usando nitrógeno líquido. Luego se homogeneizó en 7 mL de solución tampón (Fosfato de Potasio 50 mM, pH 6.6). El homogeneizado se centrifugó dos veces a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C, desechando cada vez el precipitado. El segundo sobrenadante constituyó el extracto crudo. A 10 mL de extracto crudo se le agregaron tres volúmenes de 30 mL de acetona 50% v/v y se dejó reposando a -20 °C durante cuatro horas. Luego se centrifugó a 3500 rpm por 40 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se disolvió en 4 mL de tampón fosfato de potasio (50mM, pH 6.6), obteniendo así la fracción proteica. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina de bovino como estándar protéico. La proteína total extraída de plantas tratadas con extracto y no tratadas, se prepararon muestras a la concentraciones de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para determinar la actividad enzimática.

-Actividad enzimática del AIA-Oxidasas: Se siguió el protocolo descrito por Latsague *et al.* (2007). Se partió de un extracto parcial de proteínas a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se preparó la mezcla de reacción: 0,76 mL de tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 6,0 con 0,01 mL de cloruro de magnesio 5 mM; 0,01 mL de 2-4-diclorofenol 5 mM, 0,02 mL de AIA 1,4 mM, y 0,2 mL de extracto proteico. El volumen final de la mezcla de la reacción es de 1,0 mL. El ensayo se mantuvo por 1 hora a 25 °C en oscuridad. Para determinar actividad enzimática las oxidasas del AIA utilizó el reactivo de Salkowski, midiendo la absorbancia a longitud de onda de 530 nm. La concentración se determinó ploteando la absorbancia en una curva patrón de una solución de AIA.. Una unidad de actividad AIA-O es equivalente a 1 mM AIA mg^{-1} de proteína. h^{-1}

Para probar el efecto del extracto acuoso de *I. batatas* sobre la permeabilidad celular y

conductividad eléctrica en plantas de *Phaseolus vulgaris*, se sembraron 25 semillas de frijol en bandejas de poliestireno, con zeolita como sustrato. A los 15 días se colocaron dos plántulas por tubo de ensayo, conteniendo 20 mL de extracto de *I. batatas*. Se montaron 5 tubos, que constituyeron 5 réplicas de cada tratamiento, considerándose además un testigo con agua destilada. Las plántulas se expusieron al extracto acuoso por dos horas, luego se lavaron bien con agua destilada, varias veces. Se sumergieron las raíces por 1 hora en agua desionizada para que liberaran los iones del espacio externo celular y

después se sumergieron nuevamente, también en agua desionizada por 4 horas más, cambiando las plántulas cada hora a un nuevo recipiente con dicho tipo de agua y al final se midió la conductividad en el pH-conductímetro (Inolab Level 1, Alemania) cada hora.

Los datos fueron procesados en el paquete estadístico SATGRAPHICS plus, para Windows. En el análisis estadístico del experimento de las oxidasas del AIA y conductividad se usó la prueba de t'student con un 95 % de intervalo de confianza

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto acuoso de *I. batatas* no afectó significativamente la actividad del complejo oxidásico de la auxina en las plantas de *P. vulgaris* (Figura 1). Este resultado indica que el extracto no influye directamente sobre las oxidasas del AIA y por tanto sobre el crecimiento a través de este factor. Sin embargo un efecto inhibitorio de los niveles de poliaminas o giberelinas son capaces de afectar también el crecimiento de las plantas.

En cuanto al efecto del extracto acuoso de *I. batatas* sobre la permeabilidad celular y conductividad eléctrica en plantas de *Phaseolus vulgaris*, se comprobó un mayor valor de conductividad del agua en la medida que las plantas tratadas con extracto estuvieron más tiempo colocadas en el medio de liberación (agua desionizada). Excepto en la medición a las tres horas, en todos los momentos de evaluación existieron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas con extracto y las que estaban en agua (Figura 2), que evidencia la posibilidad de que haya habido una salida de iones al agua, lo cual provocó que se elevara la conductividad eléctrica del medio donde se sumergieron las plántulas tratadas.

Estudio realizados por Taiz y Zeiger, 2002, enuncian que las giberelinas median en la actividad de la auxina, a través de la organización celular de las microfibrillas en el sentido perpendicular al eje de crecimiento, lo cual permite que la auxina ejerza su acción y se logre el crecimiento de la plantas.

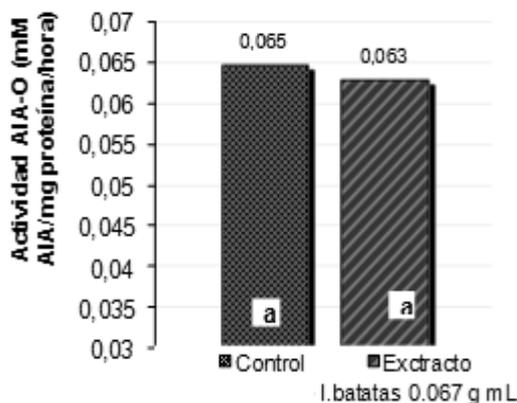


Figura 1. Efectos de la concentración del extracto acuoso de *I. batatas* sobre la actividad de las oxidasas del AIA por t'student $p \leq 0.05$

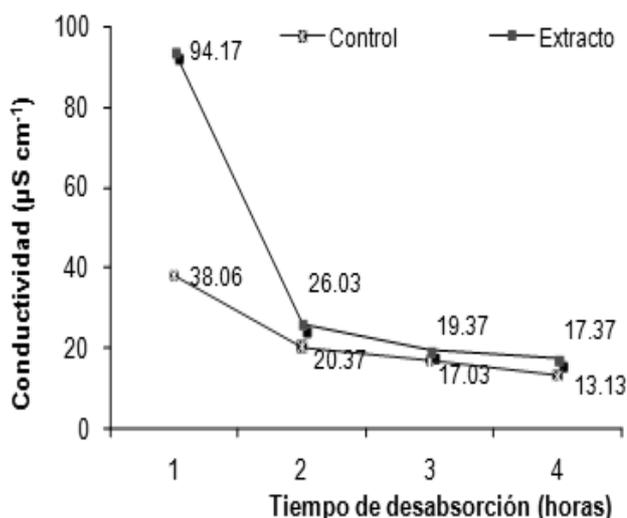


Figura 2. Conductividad eléctrica del agua destilada previo intercambio con raíces de plantas de frijol tratadas con extracto de *I. batatas* o con agua. Excepto a las 3 horas existen diferencias por t'student $p \leq 0.05$.

Experimentos similares realizados por Reigosa *et al.* (2001) con varios ácidos fenólicos, demostraron una salida de iones al medio de liberación, debido probablemente al efecto de despolarización de las membranas celulares que producen algunos de estos fenoles, específicamente el 2-benzoxazolinine (BOA) y el ácido ferúlico. Esto genera aumento de la permeabilidad celular, con la consecuente salida de iones al medio.

CONCLUSIONES

1. Se comprobó que la aplicación del extracto de *Ipomoea batatas* sobre las plántulas de frijol. no afectó la actividad de las oxidasas del AIA, por lo que se demuestra que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento no se debe a este mecanismo.

2. El extracto acuoso de *Ipomoea batatas* produjo daños a las membranas celulares de las plántulas que incrementaron su permeabilidad y con ello la reducción del crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. An, M.; J. Pratley and T. Haig: "Phytotoxicity of vulpia Residues: Investigation of aqueous extracts", *Journal of Chemical Ecology* 23 (28): 1980-1993 pp., 1997.

2. Hernández M.: Actividad alelopática de *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. e *Ipomoea batatas* (L.) Lam. sobre malezas y cultivos hortícolas. Trabajo de grado, Master en agricultura sostenible. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: 50 pp., 2007.

3. Hernández, A.; Pérez, J.M., Bosh, D.; Rivero, L., Camacho, E.; Ruíz, J.; Jimenez, E.; Marsán, R.; Obregón, A.; Torres, J.M.; González, J.E.; Orellana, R.; Paneque, J.; Mesa, A.; Fuentes, M.; Duran, J.L.; Pena, J.; Cid, G.; Ponce, D.; Hernández, M.; Prometa, E.; Fernández, L.; Garcés, N.; Morales, M.; Suárez, E.; Martínez, E. y Ruiz, J.M. Nueva Clasificación Genética de Suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. La Habana/Cuba, 64 pp., 1999.

4. Latsague, M.; Sáez, P.; Paredes, M. y Alarcón, E. "Actividad de AIA oxidasa en estacas de especies del género *Nothofagus*", *Bosque* (28): 139-141pp., 2007.

5. Reigosa, M. J., Gonzalez, L., Sanches- Morelras, A., DURAN, B., Puime, Fernández, D.A. AND Bolano, J.C. "Comparison of physiological effects of allelochemicals and commercial herbicides", *Allelopathy Journal* 8(2): 211-220pp., 2001.

6. Taiz, L. and Zeiger, E. Secondary metabolites and plant defense. En: *Plant physiology* (Ed. 3^{ra}). Sunderland/U.S.A.: Sinauer Associates, Inc: 690pp, 2002.

7. Torres, S.; Mayra Puente.; De Cupere, F.; Puerto, M.G y Rodríguez, M. "Efecto alelopático del Boniato (*Ipomoea batata* Lam.) sobre la germinación y crecimiento de cultivos y malezas", *Centro Agrícola* 30 (1): 59-63pp., 2003.

8. Walker, D.W.; T.J. Hubbel and Sedberry, J.E., "Influence of decaying sweet potato CIOP residues on nutrient uptake of sweet potato plants", *Agriculture, Ecosystems and Environment* 26 (1): 45-52, 1989.

Recibido: 12/01/2012

Aceptado: 22/03/2012