

Actividad alelopática de fracciones de extracto de *Ipomoea batatas* sobre *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Allelopathy activity of fraction of extract of *Ipomoea batatas* on *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Amed Pupo Rodríguez¹, Cristóbal Ríos Albuerne¹, Sinesio Torres García², Rafael Sosa Martínez³, Maykel Hernández Aro² y Ray Espinosa Ruiz².

1. Centro de Estudio Jardín Botánico de Villa Clara. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½ Santa Clara, V. Clara, Cuba. CP: 54830

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

3. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½ Santa Clara, V. Clara, Cuba. CP: 54830

E-mail: amedp@uclv.edu.cu

RESUMEN. Se estudiaron diferentes fracciones obtenidas por procesos cromatográficos en filtración Gel y diluciones del extracto acuoso de (boniato) *Ipomoea batatas* (L.) Lam., logrando identificar la presencia cuali-cuantitativa de los compuestos fenólicos, específicamente flavonoides. Los efectos alelopáticos de diferentes fracciones de extracto acuoso de boniato (*I. batatas*), fueron probados sobre plántulas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Sorgo) en condiciones *in vitro*. Las variables medidas fueron: longitud del hipocótilo, longitud de la radícula, peso seco y peso fresco. Los diferentes tratamientos (Extracto acuoso 8100; 162; 1 mg L⁻¹; 10⁻³⁰ mg L⁻¹; F1 a F9 fracciones) fueron administrados en base al valor de los sólidos totales disueltos empleando agua destilada y desionizada como control. Tanto el hipocótilo como la radícula fueron estimulados por la dilución 162 mg L⁻¹ más que el extracto que también lo estimuló. El tratamiento (1 mg L⁻¹) estimuló el crecimiento de la radícula mientras que no manifestó diferencia estadísticas con el control en el caso del hipocótilo. La dilución 10⁻³⁰ mg L⁻¹ no manifestó diferencia. Ninguna de las fracciones estimuló el hipocótilo de *S. bicolor*, mientras F4 y F5 estimularon el crecimiento de la radícula, la fracción 9 inhibió el crecimiento de la misma. Con la excepción de las fracciones 2 y 4 se produjo pérdida de peso fresco con respecto al control, en el peso seco no hubo variaciones.

Palabrac clave: Alelopatía, Compuestos fenólicos, Gel filtración, *Ipomoea batatas*, *Sorghum bicolor*.

ABSTRACT. It was studied different fractions obtained by gel filtration chromatography processes and dilution of the aqueous extract (sweet potato) *Ipomoea batatas* (L.) Lam, identifying the qualitative and quantitative presence of phenolic compounds, specifically flavonoids. The allelopathic effects of different fractions of aqueous extract of sweet potato (*I. batatas*), were tested on seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench (sorghum) *in vitro* condition. The variables measured were: length of the hypocotyl, radicle length, dry weight and fresh weight. The different treatment (aqueous extract 8100, 162, 1 mg L⁻¹, 10⁻³⁰ mg L⁻¹, F1- F9 fractions) were administrated based on the value of total dissolved solids using distilled and deionized water as control. The hypocotyl and radicle were stimulated by diluting 162 mg L⁻¹ more than the extract that stimulated it, too. The treatment (1 mg L⁻¹) stimulated the growth of radicle meanwhile there were no statistical differences with control in the case of hypocotyl. The dilution of 10⁻³⁰ mg L⁻¹ did not show differences. No fractions stimulated hypocotyl *S. bicolor*, although F4 and F5 stimulated the growth of the radicle, the fraction 9 inhibited the growth of it. With the exception of fractions 2 and 4, weight loss occurred with respect to cool control, and there were no variations in the dry weigh.

Keywords: Allelopathy, phenolic compounds, gel filtration, *Ipomoea batatas*, *Sorghum bicolor*.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los fenómenos alelopáticos es de gran importancia en los agroecosistemas pues enriquece la funcionalidad de las interacciones entre organismos y asegura la supervivencia de muchas especies en su medio. El término alelopatía se define como los efectos

beneficiosos o perjudiciales resultado de la acción de compuestos químicos (Aleloquímicos) liberados por una planta (donadora) que ejercen su acción sobre otras plantas (receptoras), además microorganismos a través de exudados de sus órganos. (Sampietro, 2001)

Los compuestos alelopáticos (aleloquímicos) suelen ser ácidos fenólicos, terpenos, flavonoides, alcaloides y otros compuestos del metabolismo secundario. La complejidad estructural de estas sustancias es muy variable (desde sencillos como el ácido fenólico, hasta auténticas exhibiciones de la complejidad). Los compuestos fenólicos presentes en el tejido vegetal regulan los niveles de auxinas, por influencia sobre la oxidasa del IAA y la actividad de esta enzima esta correlacionada negativa o positivamente con el crecimiento de las plantas. (Jova, 2006)

El boniato (*Ipomoea batatas*. (L) Lam) o Sweet potato es un cultivo muy común en nuestra región. El mismo tiene una amplia gama de utilidades que van

desde el consumo de su tubérculo en la dieta del hombre y alimentación de animales domésticos hasta la producción de medicamentos y harinas industriales. Diversos autores han determinado en sus estudios que el boniato presenta actividad alelopática. Torres *et al.*, (2003) determinaron que el extracto acuoso de boniato estimula el crecimiento de la radícula y el tallo en cultivos como: Melón, (*Cucumis melo* L.); Calabaza, (*Cucurbita maxima* Duch.); Maíz, (*Zea mays* L.) y Sorgo, (*Sorghum vulgare* Pers.). Con estos antecedentes nos dimos a la tarea de profundizar los estudios del extracto acuoso y sus respectivas diluciones de *I. batatas* sobre plántulas de *S. bicolor* y el efecto de las fracciones del mismo obtenidas por Filtración Gel y ultrafiltración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestro trabajo se realizó en La Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. (UCLV), en laboratorios del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), en el período comprendido entre diciembre de 2007 y mayo de 2008.

El material vegetal fue colectado en el Jardín de variedades perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), en el municipio de Santo Domingo, provincia de Villa Clara. Se colectaron hoja, tallo y flor de *I. batatas*, var. CEMSA 78-354 en el período de cosecha.

Una vez troceado el material se introdujo en una estufa Memmert (modelo 100) a 45°C por un período de 72 horas. El molinado del material seco se realizó con un molino de martillo marca VEB NOSSER 8225 NOSSEN con un tamiz acoplado de 0.5 mm de diámetro.

La maceración se realizó con una proporción de 1/10 (p/v) utilizando agua destilada y desionizada (Tabla. 1).

Colocamos el extracto en una zaranda (*Heidolph UNIMAX 1010*) a 115 rpm durante 24 horas en condiciones de oscuridad.

La filtración se realizó con papel del filtro Whatman No. 40 colocado en un Quita zato acoplado a una bomba de vacío. El extracto acuoso (Pool) obtenido fue sometido a centrifugación con una centrifuga MiniSpin a 13000 rpm por 10 min. Posteriormente se le realizaron análisis químico-físicos con el pH/conductímetro Inolab Level 1. (Tabla 2)

A partir del pool inicial se realizaron 3 diluciones en base al Total de Sólidos Disueltos (TDS). (Tabla 2)

Métodos para la obtención de las fracciones por Filtración Gel.

Se preparó una columna de Sephadex G-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) con diámetro de 16 mm y altura de 40 cm y tamaño de partícula de 13-15 µm capaz de separar sustancias cuyo peso molecular se encuentra por debajo de 700 Da. Se utilizó como eluyente agua destilada y desionizada, no solo para disminuir en lo posible, las interacciones entre la matriz y los componentes activos del pool meTablaólico, sino también para simular las características naturales de lixiviación (Gel filtration 1997). Richard, (1998).

Tabla 1. Características físico-químicas del agua destilada y desionizada

| | pH | Conductividad (mS cm ⁻¹) | Salinidad | TDS (mg L ⁻¹) | Temp. (°C) |
|--|-----|--------------------------------------|-----------|---------------------------|------------|
| H ₂ O Destilada y desionizada | 6,9 | 5,88 | 3,1 | 3,0 | 26,1 |

Volumen de la muestra 300 µL.
 Fase móvil: Agua destilada y desionizada.
 Flujo: 1mL/min.
 Volumen colectado por fracción: 2.0 mL.

Una vez que se colectan las fracciones en tubos de ensayo (alrededor de 48 a 57 tubos) se le realiza un análisis de las características físico-químicas de las mismas. (Tabla 3)

Tabla 2. Características físico-químicas del extracto acuoso de *I. batatas.*, y las diluciones del mismo

| | pH | Conductividad (mS cm ⁻¹) | Salinidad (%) | TDS (mg L ⁻¹) | Temperatura (°C) |
|------------------------|-----|--------------------------------------|---------------|---------------------------|------------------|
| Ext. acuoso (8100 ppm) | 5,5 | 2300 | 0,0 | 8100 | 26,1 |
| 162 ppm | 6,3 | 188,6 | 0,0 | 162 | 26,1 |
| 1 ppm | 6,1 | 6,0 | 0,0 | 1 | 26,1 |
| 10 ⁻³⁰ ppm | 6,5 | 3,5 | 0,0 | 10 ⁻³⁰ | 26,1 |

Tabla 3. Características físico-químicas de las fracciones del extracto acuoso de *I. batatas.* obtenidas con cromatografía de gel

| | pH | Conductividad (mS cm ⁻¹) | Salinidad (%) | TDS (mg L ⁻¹) | Temperatura (°C) |
|----|-----|--------------------------------------|---------------|---------------------------|------------------|
| F1 | 6,5 | 131 | 0,0 | 117 | 26,3 |
| F2 | 6,3 | 22 | 0,0 | 20 | 26,3 |
| F3 | 6,3 | 13 | 0,0 | 12 | 26,3 |
| F4 | 6,6 | 14,4 | 0,0 | 13 | 26,3 |
| F5 | 6,4 | 17,1 | 0,0 | 15 | 26,3 |
| F6 | 6,4 | 10,7 | 0,0 | 10 | 26,3 |
| F7 | 6,5 | 8,9 | 0,0 | 8 | 26,3 |
| F8 | 6,5 | 9,4 | 0,0 | 8 | 26,3 |
| F9 | 6,0 | 16 | 0,0 | 14 | 26,3 |

Posteriormente se lee en espectrofotómetro donde los resultados de la separación mediante filtración Gel son típicamente expresados en forma de diagrama de elusión caracterizado por señales de absorbancia a 254 nm, 260 nm y 280 nm en el espectro ultravioleta- visible modelo “génesis-6, acoplado a una Pentium-4 y utilizando el software “Visión lite” versión 2.1 de la firma Termo, perteneciente a la compañía Electrón Corporation. Estas señales se encuentran relacionadas con grupos funcionales y la proporción de los mismos en las fracciones obtenidas. (Gel Filtration, 1997)

El diseño del experimento fue al azar completamente aleatorio. Después de logrado el 50% de germinación en las semillas de sorgo se procedió al trasplante hacia tubos de crecimiento de tejido con un diámetro de 1.5 cm y 15 cm de altura cada uno con un disco de papel de filtro en su interior para la retención de extracto acuoso y/o sus diluciones y fracciones, con una plántula por tubo y se aplicaron 200 µl del tratamiento correspondiente y posteriormente se le aplicó 50 µl cada 24 h. Cada plántula se tomó como una réplica y se utilizaron 10

por cada tratamiento. Las variables medidas fueron: largo del hipocótilo en cm (LH), largo de la radícula en cm (LR), peso fresco en mg (PF), peso seco en mg (PS) de las plántulas. Los tratamientos para su aplicación se subdividieron en tres categorías para facilitar el procesado de la información

Diluciones:

- Extracto acuoso (8100 mg L⁻¹), extracto acuoso diluido 162 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ y 10⁻³⁰ mg L⁻¹.
- Fracciones obtenidas mediante filtración Gel (9 fracciones)
- Ultrafiltración con las fracciones no convencionales 10 000, 150 000 Da y 10 000 Da Np (no permeado o de rechazo)

El tiempo de realización 6 días, exposición luz/ oscuridad 12 h en cámara de flujo laminar con luz fluorescente de intensidad luminosa 564,4 Lux.

Los datos fueron procesados con paquete estadístico Statgraphics 5.0 y SPSS 8.0 para Windows. Se aplicó análisis de varianza simple, pruebas de Duncan, Tukey y Dunnett c según correspondieron.

Las semillas de sorgo (especie blanco) de la variedad CIAP 132-Rojo se obtuvieron del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

El análisis completo de un pool metabólico es difícil debido a la naturaleza heterogénea de sus componentes. La cromatografía filtración gel no conlleva a una separación total de las moléculas presentes sino que permite obtener separaciones parciales que contienen metabolitos secundarios con actividad biológica específica que varía según su masa molecular.

La determinación de la presencia de grupos de compuestos para caracterizar parcialmente de la muestra, se realizó mediante diferentes métodos (espectrofotométricos en la región U.V, además análisis de parámetros como conductividad, pH, sólidos totales disueltos. Dependiendo del proceso de maceración de la muestra, conservación, tipo de especie, época de colecta, estado fisiológico de la planta, partes de tejido vegetal, los componentes del pool metabólicos se encontraron en diferentes relaciones cuali-cuantitativas y se determinaron los parámetros siguientes:

Determinación de compuestos fenólicos totales: fueron determinados por método descrito por (Sigleton and Rossi, 1965) con algunas modificaciones.

Determinación de compuestos flavonoides totales: La presencia de flavonoides totales se determinó por ensayo reportado por (Zhishen, Menbcheng and Jianming, 1999).

Sólidos Totales Disueltos (TDS): Es un valor muy significativo desde el punto de vista cuantitativo ya que cuantifica la presencia de sólidos disueltos en las muestras de análisis y mediante el mismo se puede calcular las dosis aplicar en los ensayos biológicos. Se determinó utilizando el pH-metro/conductímetro (Inolab level 1)

Conductividad: El flujo de corriente eléctrica involucra el transporte de cargas eléctricas, por lo tanto, el hecho de que las fracciones acuosas conduzcan la corriente eléctrica, implica la presencia de especies disociadas que generan iones relacionados con la disociación de ácidos orgánicos

como cinnámico, cafeico, benzoico, p-hidroxibenzoico y otros también de naturaleza orgánica responsables de actividades alelopáticas. Por otro lado permite el seguimiento, control y caracterización del pool metabólico.

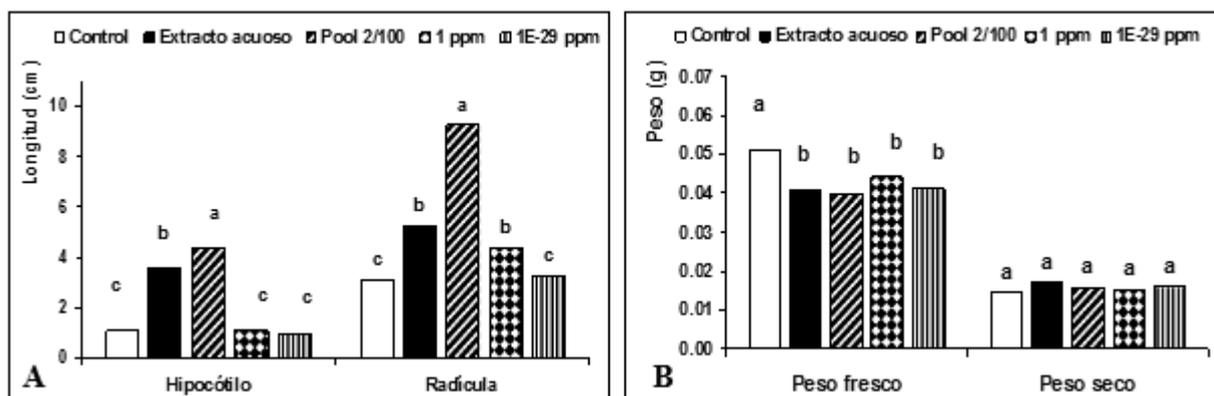
Potencial hidrogénico (pH): En los extractos vegetales pueden encontrarse varios tipos de compuestos, los cuales confieren a cada extracto en particular, diferentes pH. A nivel molecular las diferencias están dadas por la naturaleza de las especies químicas, distribución y número de grupos carbonilo e hidroxilos presentes. Además, puede asociarse con la ocurrencia de procesos fermentativos durante el almacenamiento. Permite al igual que la conductividad el seguimiento, control y caracterización del pool metabólico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la excepción del tratamiento 10^{-30} ppm y 1 ppm el extracto acuoso estimuló el crecimiento tanto del hipocótilo como de la radícula de la plántula de frijol. La máxima actividad alelopática se alcanzó con la mayor concentración probada (8100 ppm) creciendo 2.5 veces más que el control. A medida que disminuyeron las concentraciones el efecto alelopático a su vez también fue disminuyendo en el caso del hipocótilo. Mientras que la mayor estimulación en el caso de la radícula se expresó a la concentración de 162 ppm, entre los demás tratamientos hubo diferencia significativa con respecto al testigo pero no entre ellos. An *et al.*, (2005) encontraron un modelo dosis respuesta para el estudio de los efectos alelopáticos, del cual se deduce que la actividad estimulante del extracto acuoso puede ser debida a que en la proporción de macerado (peso/volumen) de la muestra se logró un punto de concentración de los aleloquímicos, cercano al máximo de actividad estimulante (punto máximo en el área de estimulación). Basados en este mismo modelo se explica que el efecto inhibitorio de las disoluciones del extracto acuoso, con la disminución de la concentración, puede ser debido a que en esa misma medida la concentración de los aleloquímicos disminuye y el punto de máxima actividad se corre hacia la izquierda de la curva, acercándose al efecto logrado por el control, pues la diferencia no es significativa. El peso seco y peso fresco de las plántulas de frijol no se alteró lo que

evidencia que el extracto y sus diluciones no producen daños en el proceso de respiración. Con respecto a la formación de raíces secundarias el

tratamiento extracto acuoso fue capaz de incrementar el valor de estimulación en un 10% por encima del control. (Figura 1)



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco, medias con letras desiguales difieren por Duncan para $p < 0.05$.

Figura 1. Efectos de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *I. batatas* sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A), peso fresco y seco (B), de plántulas de *S. bicolor*.

Peterson *et al.* (2002), obtuvieron al menos 8 fracciones de extractos de cortex de *Ipomoea batatas* (boniato) detectando la presencia de ácidos fenólicos como caféico, clorogénico, *p*-cumárico, *trans*-cinámico e isómeros del ácido dicafeoil quínico, los cuales se hallaban hasta en un 96% del total de los fenoles, así como niveles elevados de cumarinas como la escopoletina y su glucósido, la escopolina. De las 9 fracciones obtenidas mediante filtración Gel, solamente dos F6 y F5 manifestaron actividad estimulante frente al hipocótilo, estimulando su crecimiento 2.0 y 1.5 veces más que el control mientras las restantes fracciones no expresaron diferencias estadísticamente significativas para esta variable (Fig. 2). Estos resultados se ajustan a los modelos y consideraciones teóricas expresadas por (An *et al.*, 2005) en cuanto a que la disminución de la concentración puede originar incrementos en los efectos alelopáticos específicamente los relacionados con la estimulación.

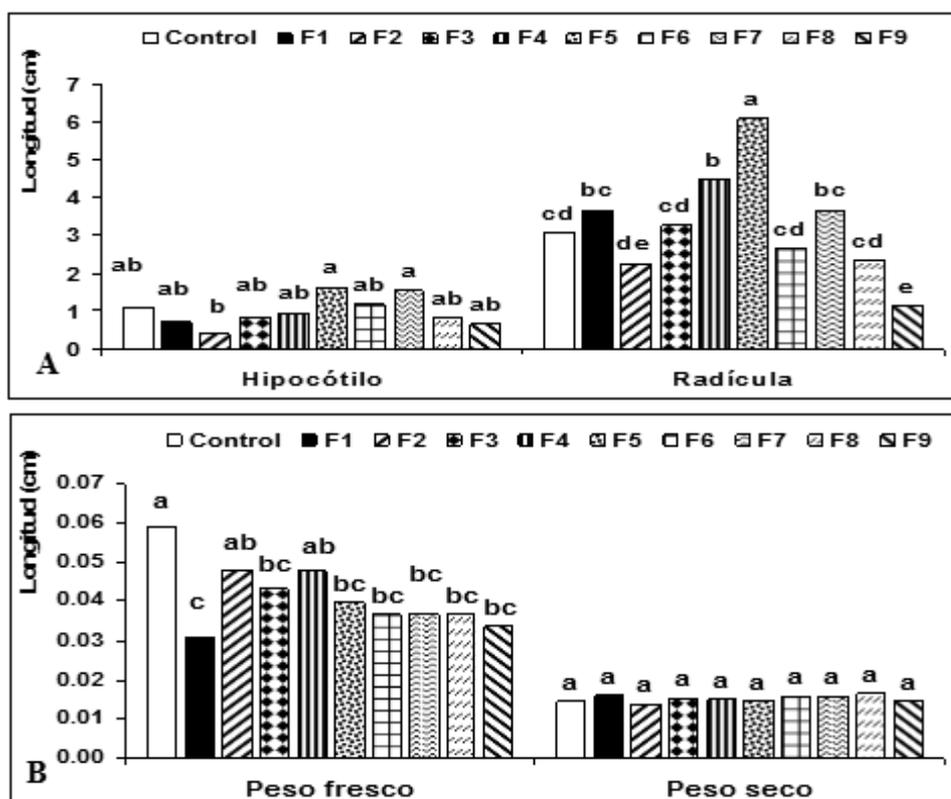
Los resultados para la longitud de la radícula expresan carácter estimulante solamente para la fracción 7 duplicando la longitud con respecto al control. El resto de las fracciones no manifestaron diferencias estadísticamente significativas.

La formación de raíces secundarias se vio afectada en un 22 % por las fracciones 1, 2, 8 y 9 por debajo del control. El resto de las fracciones no modificaron significativamente el proceso inhibición/estimulación,

en la misma medida tampoco se afectaron el peso fresco y el peso seco.

En la realización de estudios no pueden ser separados los efectos de competencia por las dianas moleculares en las diferentes partes de la planta ya que los mismos ocurren de forma simultánea y ello tributará a incrementar en parte la complejidad del sistema por ello en nuestro caso resulta difícil explicar un comportamiento de estimulación/inhibición frente al hipocótilo sin que el mismo este vinculado de forma directa o indirecta con alguna transformación en la radícula, hipocótilo o número de raíces secundarias máxime cuando nuestros tratamientos son de hecho heterogéneos en composición (John *et al.*, 2006).

Se puede apreciar el contenido de compuestos fenólicos y específicamente dentro de estos los flavonoides (figura 4) encontrándose que en la fracción 1 el 90% aproximadamente son flavonoides, en las fracciones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 el contenido de éstos flavonoides oscila entre 60 y 62%, mientras que en las fracciones 8 y 9 el nivel de flavonoides disminuye hasta 57 y 59% respectivamente. Peterson *et al.* (2002), obtuvieron al menos 8 fracciones de extractos de cortex de Boniato que inhibían la germinación de *Panicum milliaceum* L. (Millo), detectando la presencia de ácidos fenólicos como caféico, clorogénico, *p*-cumárico, *trans*-cinámico e isómeros del ácido



Para hipocótilo, radícula, peso fresco y seco, medias con letras desiguales difieren por Tukey para $p < 0.05$.

Figura 2. Efectos de las fracciones procedentes del extracto acuoso de *I. batatas* obtenidas mediante la técnica filtración Gel sobre el crecimiento longitudinal del hipocótilo y la radícula (A),

dicafeoil quínico, los cuales se hallaban hasta en un 96% del total de los fenoles, así como niveles elevados de cumarinas como la escopoletina y su glucósido, la escopolina.

mayor crecimiento en la radícula no siendo así en el hipocótilo.

3. Se constató que el método de filtración gel con Sephadex G-10 resulta muy eficiente para obtener fracciones de pequeños volúmenes.

4. Se logró identificar la presencia cuali-cuantitativa de compuestos fenólicos y en específico flavonoides entre un 60 y 90%.

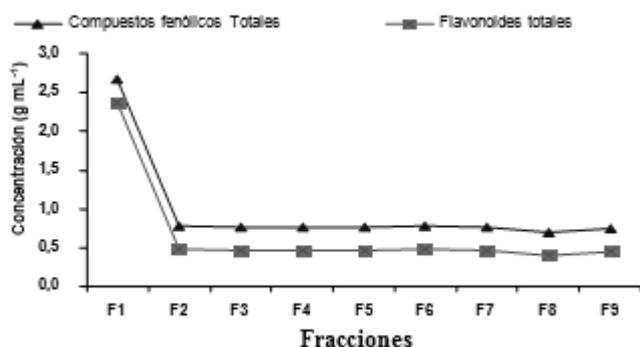


Figura 4. Contenido de Compuestos fenoles totales y Flavonoides totales de las fracciones

CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso estimula el crecimiento tanto del hipocótilo como de la radícula de las plántulas de *S. bicolor*.

2. Se evidenció que las plántulas tratadas con las fracciones 4 y 5 fueron las que manifestaron un

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Ricardo y Andrés J. L. Recuperación de proteínas del lactosuero. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Oviedo. España. 496 pp, 1991.

2. An, M., Pratley, J. E., Haig, T.: Whole-range assessment: a simple method for analysing allelopathic dose-response data *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, 3: 245–260, 2005.

3. John, J, Patil, R.H., Joy M. and Nair A.M.: “Methodology of Allelopathy Research: 1. Agroforestry systems” *Allelopathy Journal*” 8(2): 173-214, 2006.

4. Jova Sáez Danelis.: Efecto alelopático inducido por diferentes fracciones procedentes del extraxto acuoso de orozuz (*Phyla strigulosa* (Mart & Gal.). Mold sobre la germinación de maíz. Tesis de Diploma, 2006.

5. Pazmiño, A.: Universidad de Chile, Escuela de Agronomía y Fisiología Vegetal, 1999.

6. Peterson, J.K., Harrison, H.F. and Snook, M.E.: Bioassay guided isolation of seed germination inhibitors from sweetpotato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Regal] cortex tissue. Allelopathy Journal, 9 (2): 177-186p, 2002.

7. Rosabal, Vega, J.; Puyans Garcell, L.: “Hidrodinámica y separación mecánica”, Tomo I, 296, Cuba, 1988.

8. Sampietro, D. A.: Alelopatía: Conceptos, Características, Metodología de Estudio e Importancia. [en línea]. Recuperado en: <http://www.faiunne.edu.ar/biología/alelopatía/alelopatía.html> [11/7/2007], 2001.

9. Singleton, V. L., and Rossi, J. A. Jr.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144–158, 1965.

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

11. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W.: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64: 555–559, 1999.

Recibido: 17/10/2011

Aceptado: 09/02/2012