

EFFECTS ALELOPÁTICOS DE *TRIDAX PROCUMBENS* L.

Marta Krautmann¹, Silvia Turbay y Elmira Riscala

Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900, (4000) San Miguel de Tucumán, República Argentina.

¹ Autor a quien dirigir la correspondencia.

Resumen

El objetivo de este estudio es el análisis de la capacidad de un metabolito del subextracto clorofórmico de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae-Heliantheae) para afectar la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. var. *Grand rapid* (Asteraceae). Para ello se determinó: el número de semillas germinadas, la longitud de plántulas, las alteraciones enzimáticas y de permeabilidad celular y el índice mitótico. Con las partes aéreas de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae-Heliantheae) se preparó un extracto clorofórmico que fue fraccionado por columna de sílica gel con solventes de diferente polaridad; se recogieron 253 fracciones que fueron purificadas por cromatografía líquida-líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). De los distintos compuestos purificados se seleccionó, para este trabajo, el proveniente de la fracción N° 176 por presentar en IR bandas de absorción a 1.760 cm⁻¹ que se asignan a carbonilo de lactona, compuestos de conocida actividad biológica: herbicida, bactericida, funguicida, entre otras. La germinación de semillas se realizó en cajas de Petri; fueron empleadas concentraciones de lactona de 250, 500, 750 y 1.000 ppm y agua y cloroformo como testigos; las semillas se incubaron a 25 °C durante 96 horas, y luego se efectuaron las determinaciones indicadas. Los resultados muestran que el metabolito ensayado no influye en el número de semillas germinadas pero sí afecta profundamente el crecimiento de las plántulas, donde se observaron alteraciones morfológicas y fisiológicas. Por esta razón podemos concluir que el compuesto ensayado tiene acción herbicida sobre el crecimiento de *Lactuca sativa* L. var. *Grand rapid* (Asteraceae) que actúa luego de la emergencia de la raíz.

ALLELOPATHIC EFFECTS OF *TRIDAX PROCUMBENS* L.

Summary

The objective of the present work is to analyse the capacity of one chloroform subextract metabolite of *Tridax procumbens* L. (Asteraceae-Heliantheae) to affect seed germina-

Palabras clave: maleza - lactona - alelopatía - germinación - *Tridax procumbens* L.

Key words: weed - lactone - allelopathy - germination - *Tridax procumbens* L.

tion of *Lactuca sativa* L. var. *Grand rapid* (Asteraceae). In this sense, number of germinated seeds, length of seedlings, enzymatic and cells permeability alterations and mitotic index were determined.

Chloroformic extract was prepared from aerial part of *Tridax procumbens* L. (Asteraceae-Heliantheae) and was further fractionated by column chromatography (Silica gel, increasing polarity solvent mixtures) obtaining 253 fractions, and purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). One of the purified (from Fr 176) compounds presented an IR absorption band at 1.760 cm^{-1} which is typical of carbonyl group of sesquiterpene lactones (estructures of recognized biological activity) was selected for this work.

Seed germination assays were performed at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Petri dishes by using lactone concentrations of 250, 500, 750 and 1.000 ppm. Water and chloroform were used as control treatments. After 96 hours of incubation the above mentioned determinations were performed.

Results show that the tested metabolite does not affect the number of germinated seeds but it affects seedling growth in the sense that morphologic and physiologic alterations are observed. Thus, we can conclude that the tested compound has a certain herbicide effect on growth of *Lactuca sativa* L. var. *Grand rapid* (Asteraceae) that acts after root protrusion.

Introducción

La competencia que ejercen las malezas en las especies cultivadas a las que se asocian, es uno de los grandes problemas que afectan la producción agropecuaria. Los métodos empleados para combatir malezas se basan principalmente en el uso de compuestos químicos que son, en general, perjudiciales para el medio ambiente debido a que contaminan las aguas y el suelo.

Existe un especial interés en el ámbito científico internacional en determinar cuáles son los metabolitos elaborados por las plantas que pueden o tienen capacidad de alterar el desarrollo de otras especies.

Al respecto se han informado, en los últimos 20 años, los resultados de numerosas investigaciones, (Rice, 1984; Lydon y col., 1997; Nawamaki y Kuroyagi, 1996; Rizvi y col., 1999). Es particularmente interesante la revisión realizada por Alan Putman (1983) y la publicación *Advances in Chemical Ecology* de Harborne (1993). En la India, Baruah y col. (1994) ensayaron el efecto inhibitorio de las lactonas sobre la germinación y el crecimiento de varias especies cultivadas; además, en este trabajo se formulan propuestas sobre la relación que existe entre la estructura y la bioactividad de las lactonas sesquiterpénicas.

Los experimentos de laboratorio realizados por Fisher, Weidenhamer y Bradow (1989) compararon el efecto inhibitorio de seis lactonas sesquiterpénicas sobre la germinación de 16 especies monocotiledóneas y 9 especies dicotiledóneas. Observaron inhibición a concentraciones muy bajas (1mM) y sostienen que cuando las plantas liberan lactonas sesquiterpénicas en el suelo ejercen efectos negativos en el crecimiento de las especies vecinas.

Este trabajo constituye parte de un proyecto dirigido al aislamiento y la purificación de metabolitos producidos por malezas, para luego determinar si los metabolitos pueden inhibir el crecimiento de otras especies vegetales. Se propone encontrar herbicidas naturales no contaminantes que permitan la conservación de los suelos.

El compuesto para este ensayo presenta bandas en el IR que se asignan a carbonilo de lactona. Según la literatura, las lactonas tienen, además, otros efectos biológicos: fungicidas (Ando e Isogai, 1991; Jarvis y col., 1988; Rice, 1998), bactericidas y citotóxicos (Picman, 1986; Mazid y col., 1999; Esimone y Adikwn, 1999), entre otros.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material empleado fue *Tridax procumbens* L. (Asteraceae-Heliantheae), (Botta y Cabrera, 1986; Robinson, 1981), una especie frecuente en las regiones tropicales, a menudo con carácter de maleza. En América se extiende desde el Sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Bolivia. En la Argentina ha sido encontrada en la Provincia de Jujuy en 1983. El primer informe acerca de la presencia de esta especie en Tucumán fue realizado en diciembre de 1993 por la Cátedra de Química Orgánica (Facultad de Agronomía y Zootecnia-Universidad Nacional de Tucumán). Un ejemplar de referencia fue depositado en el Herbario del Instituto Miguel Lillo de Tucumán (LIL 597.214).

Preparación de los extractos

El material vegetal recolectado fue secado a temperatura ambiente y a la sombra. Luego se procedió de la siguiente forma (Hernández y col., 1996). Fueron juntadas las hojas y las flores (1.276 g) y posteriormente extraídas con cloroformo (2x6 l) durante 7 días a temperatura ambiente y con agitación ocasional. La evaporación del solvente dejó un residuo (extracto clorofórmico) de 107 g (rendimiento: 8,38 %). A continuación se realizó la partición del extracto, que fue suspendido en 916 ml de etanol a 50 °C y luego diluido con 687 ml de agua. La suspensión fue extraída sucesivamente con hexano (2x350 ml) y cloroformo (2x350 ml) y se obtuvo el subextracto hexánico (SEH) y el subextracto clorofórmico (SEC), respectivamente.

El SEC (20 g) fue fraccionado por cromatografía en columna de sílica gel (relación g extracto/g sílica gel 1:30); los solventes utilizados fueron, primero, cloroformo (2 volúmenes de columna) y luego, mezclas cloroformo-acetato de etilo de polaridad creciente (5-100 %). De esta columna se recolectaron 253

fracciones que fueron controladas por cromatografía en capa fina (TLC) y agrupadas según sus perfiles cromatográficos.

Para las TLC se empleó como fase fija cromatofolios de sílica 60 F₂₅₄ (Merck artículo 5.554) y, como fase móvil, cloroformo puro (fracciones 1-28), CHCl₃-AcOEt 2:0,05 (fracciones 29-45), CHCl₃-AcOEt 2:0,15 (fracciones 46-69), CHCl₃-AcOEt 2:0,40 (fracciones 70-96), CHCl₃-AcOEt 2:0,80 (fracciones 97-123), CHCl₃-AcOEt 2:1 (fracciones 124-137), CHCl₃-AcOEt 2:1,5 (fracciones 138-175), CHCl₃-AcOEt 1:1 (fracciones 176-195), CHCl₃-AcOEt 1,2:2 (fracciones 196-200), CHCl₃-AcOEt 0,80:2 (fracciones 201-204), CHCl₃-AcOEt 0,20:2 (fracciones 205-208), AcOEt puro (fracciones 209-226); AcOEt-CH₃OH 2:0,15 (fracciones 227-239) y AcOEt-CH₃OH 2:0,30 (fracciones 240-253).

Para los ensayos de actividad biológica se seleccionó un compuesto proveniente de la fracción N° 176, cuyo IR indica la presencia de carbonilo de lactona (1.760 cm⁻¹), que fue purificado por cromatografía líquida-líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Se utilizó una columna Beckman ultrasphere, octyl (10 mm x 250 mm), el solvente de corrida MeOH-H₂O (1:1) a 2 ml/min. El tiempo de retención para el compuesto ensayado fue de 11,5 min.

Pruebas biológicas

a) Ensayos sobre germinación

Para observar las alteraciones en el proceso de germinación se empleó el método de Kato y col. (1977). Se impregnaron papeles de filtro (Whatman GP) de 9 cm de diámetro con soluciones clorofórmicas de 250, 500, 750 y 1.000 ppm del compuesto ensayado. Como blancos se emplearon papeles de filtro, unos impregnados con cloroformo y otros, con agua. Por medio de un desecador al vacío se evaporó el solvente y los papeles fueron distribuidos individualmente en cajas de Petri. Sobre cada papel se colocaron 25 semillas de lechuga, *Lactuca sativa* L. var. *Grand rapid* (Asteraceae) y se agregó 3 ml de agua bidestilada para conservar el ambiente húmedo.

Las cajas de Petri fueron incubadas a 25 °C en oscuridad durante 96 horas. Cada experimento se repitió cuatro veces, tanto para cada concentración como para los blancos.

Diariamente fueron contadas las semillas que dispararon su radícula, que fueron consideradas semillas germinadas.

b) Longitud de plántulas

Al cabo de 96 horas de incubación las longitudes de las plántulas fueron medidas con precisión de ± 1 mm. También se realizaron observaciones a la lupa, en particular de las plántulas más afectadas (torsiones, necrosis, falta de pelos radiculares, geotropismo negativo, entre otros).

c) Actividad deshidrogenásica

Sobre las plántulas se determinó la actividad de deshidrogenasas usando el método del cloruro de trifeniltetrazolio, (Steponkvs, 1971) y se repitieron las determinaciones para cada concentración y cada testigo por triplicado. El reactivo utilizado fue el 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0,6 % en buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M pH 7,4). Con 3 ml de este reactivo, 100 mg de material vegetal fue incubado durante 15 horas a 25 °C. Una vez filtrado y sumergido en etanol al 95 % (10 ml) fue calentado en baño de María (BM) hirviendo durante 5 minutos; se obtuvo así una solución coloreada. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro a 530 nm.

d)Evaluación de la conductividad del eflujo celular

Por medio de la técnica de Dexter (1932) se realizó el ensayo con las plántulas (500 mg) que emergieron hasta las 96 horas; fueron incubadas durante 15 horas a 25 °C en 10 ml de agua bidestilada y desionizada. Por medio de un conductímetro 644-Metrohm fue determinada la conductividad específica frente a una solución patrón de KCl 0,1 N.

e)Efecto sobre la división celular

Los meristemas radicales se fijaron en una solución de alcohol etílico y ácido acético en una proporción 3:1 durante 24 horas; luego fueron hidrolizados en HCl 1N a 60 °C durante 3 minutos. Para realizar los preparados se empleó hematoxilina al 2 % como colorante, y citrato férrico al 1 %, como mordiente. Para determinar el índice mitótico se escogieron campos microscópicos al azar (Andrada y col., 1975).

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey ($p < 0,05$) para confrontación de medias.

Tabla 1.- Porcentajes de semillas germinadas a diferentes concentraciones del compuesto ensayado

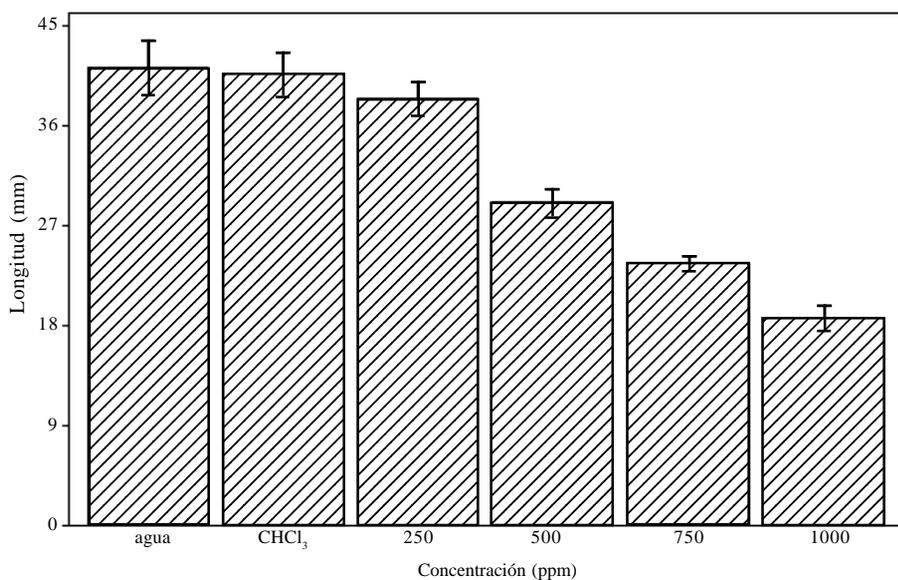
Tiempo	AGUA	CHCl_3	100 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm
24 h	2 ± 2,2	0,4 ± 1,3	1,5 ± 1,8	2,1 ± 2,1	2,8 ± 4,3	3,8 ± 3,6	3,7 ± 4,5
48 h	47,1 ± 17,2	48,3±12,6	48,5 ± 9,6	48,3 ± 8,2	48,5 ± 9,7	45,7 ± 13,6	44,3 ± 12,5
72 h	59,8 ± 12,8	60,0 ± 11,8	59,7 ±10,8	60,4 ± 10,1	59,9 ± 10,3	57,1 ± 12,3	56,4 ± 11,7
96 h	64,3 ±13,8	68,5 ± 12,0	67,8 ± 19,3	64,0 ± 11,2	65,4 ± 9,8	60,2 ± 11,9	62,7 ± 10,4

Resultados y discusión

La lactona ensayada tiene escasa influencia en el porcentaje de las semillas germinadas. Los valores obtenidos no muestran diferencias significativas entre los testigos y las distintas concentraciones empleadas.

Se observa una notable disminución de la longitud total de la plántula a medida que aumenta la concentración de la lactona. Al comparar los valores obtenidos en el testigo agua y en 1.000 ppm puede apreciarse una reducción de aproximadamente 60 % de la longitud.

Gráfico 1.- Longitud de las plántulas en relación con las distintas concentraciones de la lactona en estudio ($p < 0,05$)



La actividad de deshidrogenasas resultó notablemente alterada en las plántulas tratadas con el compuesto en estudio. Los resultados muestran un incremento de la actividad enzimática; a medida que aumenta la concentración de la lactona se acentúa el efecto, presentando diferencias significativas entre los testigos y los tratamientos de 750 y 1.000 ppm.

Los valores de conductividad del eflujo celular obtenidos no presentan diferencias significativas entre los testigos y las concentraciones ensayadas (250, 500, 750 y 1.000 ppm).

Gráfico 2.- Actividad de deshidrogenasas en función de concentración de la lactona ($p < 0,05$)

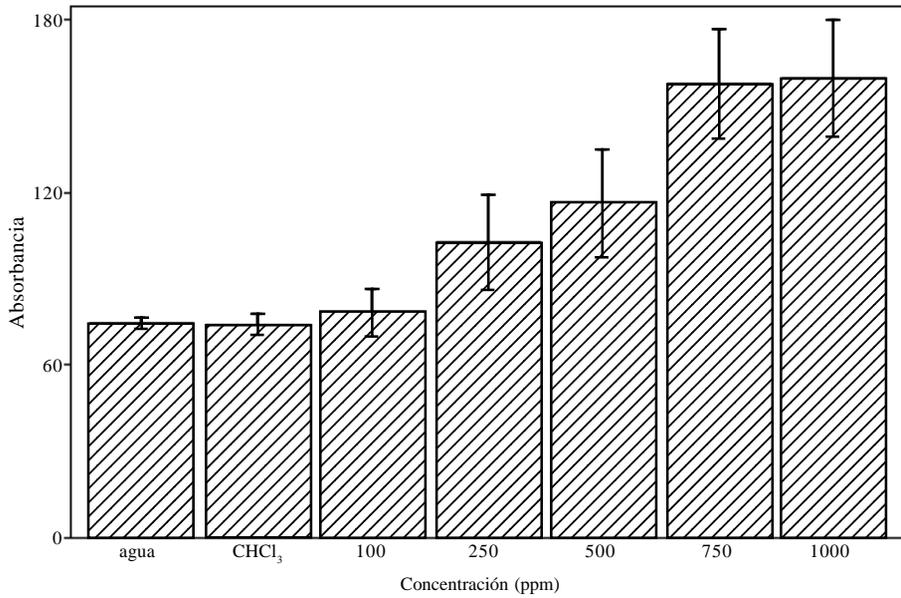
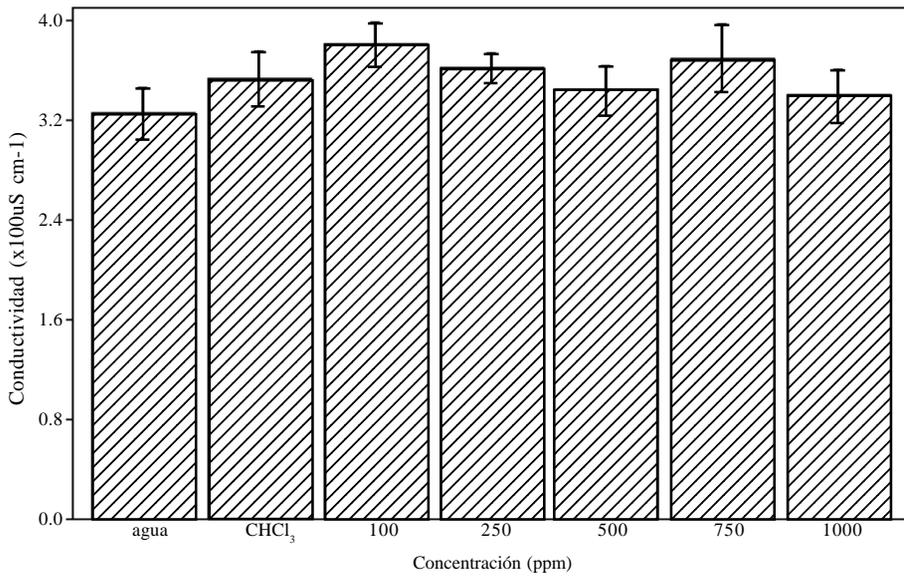
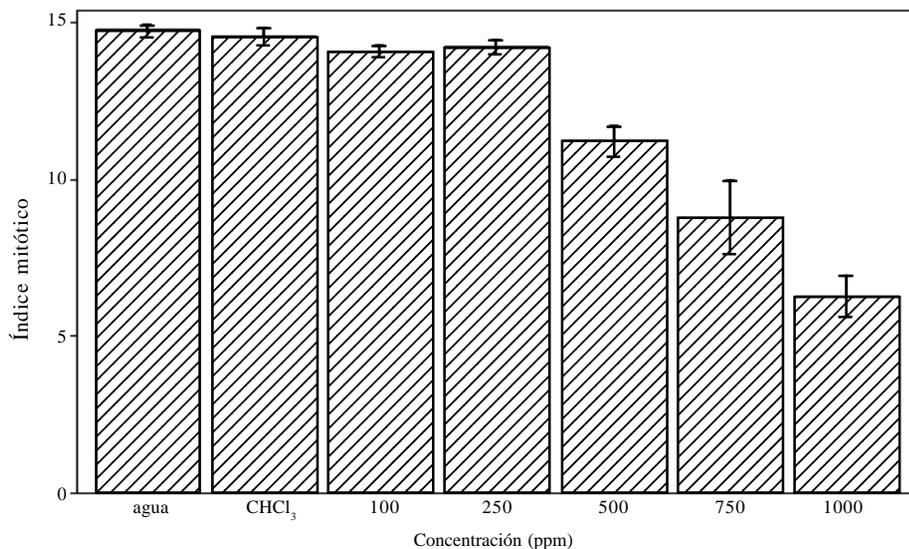


Gráfico 3.- Alteraciones de la conductividad con las diferentes concentraciones de la lactona en estudio ($p < 0,05$)



En relación con el índice mitótico, solo en altas concentraciones la lactona probada produce disminución del número de células en división de los meristemas radiculares. Como se observa en este gráfico, a 250 ppm los valores obtenidos son casi iguales a los correspondientes a los testigos; en cambio, se produce un fuerte decremento a 750 y 1.000 ppm. Estos resultados indican que el compuesto probado produce un efecto inhibitorio sobre la división celular en el meristema radicular y explica la disminución de la longitud de las plántulas, ya que los valores de índice mitótico y longitud de plántula a 500, 750 y 1.000 ppm presentan las mismas variaciones.

Gráfico 4.- Variaciones del índice mitótico según las distintas concentraciones de lactona aplicadas ($p < 0,05$)



Conclusiones

Se puede concluir que el compuesto ensayado tiene acción herbicida sobre el crecimiento de *Lactuca sativa* L. var. *Grand rapid* (Asteraceae) que se manifiesta en la etapa postgerminativa. Es posible que los efectos observados se deban a que el metabolito en estudio no puede ser transportado hacia el embrión a través de los tegumentos de las semillas; ejerce la acción herbicida cuando emerge la radícula.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT) por el apoyo financiero otorgado.

Referencias bibliográficas

- Ando, M. e Isogai, K. (1991). "Studies on the synthesis of sesquiterpene lactones and their biological activities". *J. Org. Chem.* 54 (4): 1017-1024.
- Andrada, A.B.; Boggiatto, A.J.; Auad, L.G. y Collado M. (1975). "Estudios citogenéticos en el híbrido intergenérico *Euchlaena perennis* Hitch. por *Zea mays* L. I. Análisis meiótico en plantas de dos generaciones". *R.A.N.A.* 12 (3-4): 323-330.
- Baruah, N.C.; Sarma, J.C.; Barua, N.C.; Sarma, S. y Sharma, R.P. (1994). "Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*". *Phytochemistry* 36 (1): 29-36.
- Botta, S.M. y Cabrera, A.L. (1986). "Novedades para la flora de Jujuy". *Darwiniana* 27 (1-4): 1-8.
- Dexter, S.T. (1932). "Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity". *Plant Physiology* 7: 63-78.
- Esimone, C.O. y Adikwn, M.V. (1999). "Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Romalina farinacea*". *Fitoterapia* 70 (4): 428-431.
- Fischer, H.; Weidenhamer, J.D. y Bradow, J.M. (1989). "Sesquiterpene lactones: structure and biological action". *J. Chem. Ecol.* 15: 1785-1793.
- Harborne, J.B. (1993). "Advances in Chemical Ecology". *Natural Product Reports*: 327-348.
- Hernández, L.R.; Riscala, E.C.; Catalán, C.A.N.; Díaz, J.D. y Herz, W. (1996). "Sesquiterpene lactones and other constituents of *Stevia maimarensis* and *Synedrellopsis grisebachii*". *Phytochemistry* 42 (3): 681-684.
- Jarvis, B.B.; Midiwo, J.O.; Bean, G.A.; Abdoul-Nasr, M.B. y Barras, C.S. (1988). "The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species". *J. Nat. Prod.* 51 (4): 736-744.
- Kato, T.; Tsunakawa, M.; Sasaki, N.; Aizawa, H.; Fujita, K.; Kitahara, Y. y Takahashni, N. (1977). "Growth and germination inhibitors in rice husks". *Phytochemistry* 16: 45.
- Lydon, J.; Teasdale, J.R. y Chen, P.K. (1997). "Allelopathic activity of *Artemisia annua* and the role of artemisinin". *Weed Science* 45 (6): 807-811.
- Mazid, M.A.; Hasan, C.M. y Rashid, M.A. (1999). "Antibacterial activity of *Parmelia Kamstchandalis*". *Fitoterapia* 70 (6): 615-617.
- Nawamaki, K. y Kuroyanagi, M. (1996). "Sesquiterpenoids from *Acourus calamus* as germination inhibitors". *Phytochemistry* 43 (6): 1175-1182.
- Picman, A.K. (1986). "Biological activity of sesquiterpene lactones". *Biochem. Syst. & Ecol.* 14: 255-281.
- Putman, A.R. (1983). "Allelopathic chemicals Nature's herbicides in action". *Chemical & Engineering News Special Report*: 34-45.
- Rice, E.L. (1984). *Allelopathy*, 2nd, Academic Press, New York, 422 pp.
- Rice, E.L. (1998). "Biological control of weeds and plant diseases: advances in applied allelopathy". *J. Chem. Ecol.* 24 (3): 439.
- Rizvi, S.J.H.; Tahir, M.; Rizvi, V.; Kohli, R.K. y Ansari, A. (1999). "Allelopathic interactions in agroforestry systems". *Plant Science* 18 (6): 773-796.
- Robinson, H. (1981). "A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae)". *Smithsonian Contrib. Botany* 51: 1-102.
- Steponkvs, P.L. (1971). "Effect of freezing on dehydrogenase activity and reduction of triphenil tetrazolium chloride". *Cryobiology* 8: 570-573.

