

Acción del ivasperín en el alargamiento de coleóptilos de avena y su relación con el ácido indol acético¹

Action of the ivasperín in the oat coleoptile lengthening and their relationship with the indol acetic acid

S. Gianfrancisco, A. Pastoriza y E. Riscalá

Resumen

El ivasperín es una lactona natural que produce alteraciones de radículas e hipocótilos en diferentes especies. El objetivo del presente trabajo fue determinar si este compuesto actúa como inhibidor de la acción de las auxinas en el alargamiento celular de segmentos de coleóptilos de avena. Para ello granos de avena de la variedad Cristal fueron puestos a germinar en oscuridad. Al cabo de 72 h se cortaron segmentos de coleóptilos, eliminando el meristema apical, colocándose en papeles de filtro embebidos con diferentes concentraciones de ivasperín: 0, 300, 600 y 1000 mg L⁻¹, agregándose ácido indol acético (AIA) a concentraciones de 0,0875 y 0,175 mg L⁻¹, y una solución de sacarosa al 3% como medio base. Luego de 16 h se midió su longitud. Los resultados muestran que el ivasperín produjo una disminución del alargamiento de los segmentos, con una respuesta mayor cuando la concentración del mismo se incremento. Se observó un mayor alargamiento cuando se aplicó AIA 0,0875 mg L⁻¹, para todas las concentraciones de ivasperín, en relación a los tratamientos sin AIA. Cuando la concentración de AIA usada fue 0,175 mg L⁻¹, se observó un menor alargamiento respecto al testigo en todas las concentraciones de ivasperín, indicando un efecto inhibidor en alta concentración. Estos resultados permitieron inferir que el efecto producido por el ivasperín en las concentraciones probadas no posee un carácter inhibidor de la acción de las auxinas en el alargamiento celular de segmentos de coleóptilos de avena.

Palabras clave: ácido indol acético, alargamiento celular, ivasperín

Recibido el 9-10-2000 ● Aceptado el 6-7-2001

1. Trabajo financiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán.
2. Departamento de Biología, Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Avda. Roca 1900. C.C.125. CP 4000. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. elmain@manant.unt.edu.ar

Abstract

Alterations in radicles and hypocotyls of different species are produced by ivasperin, a natural lactone. The objective of the present work is to determine if the ivasperin acts as an inhibitor of auxin action in the cellular lengthening of oat coleoptile segments. Grains of Cristal variety oats were put to germinate, in darkness. After 72 h coleoptile segments were cut, eliminating the apical meristem and were placed with different ivasperin concentrations: 0, 300, 600 and 1000 mg L⁻¹, indole acetic acid (AIA) in concentrations of 0,0875 and 0,175 mg L⁻¹, and a sucrose solution at 3% as base medium. After 16 h their longitude was measured. Results show that ivasperin produces a decrease in segment length, with a greater response as the ivasperin concentration increases. When AIA 0,0875 mg L⁻¹ is applied a major lengthening is observed, for all ivasperin concentrations, in relation with treatments without AIA. In all ivasperin concentrations when the AIA concentration was 0,175 mg L⁻¹, a smaller lengthening was observed with regard to the control, indicating an inhibitor effect at high concentration. These results allow us to infer that the effect produced by ivasperin in the tested concentrations does not act as an inhibitor of the auxin action in the cellular lengthening of oat coleoptile segments.

Key words: cellular lengthening, indole acetic acid, ivasperin.

Introducción

El crecimiento de un órgano implica que se produzca la división y alargamiento celular en sus meristemas; la inhibición total o parcial de uno de estos procesos o de ambos se verá reflejada en un menor crecimiento del mismo. En los procesos del crecimiento, están involucradas las auxinas, siendo su característica principal la de promover el alargamiento celular en coleóptilos y tallos entre los 10 y 20 min posteriores a su aplicación (2); esto va acompañado por un incremento en la biosíntesis de elementos de la pared celular, su alargamiento y la liberación de protones.

Los inhibidores, en su mayoría compuestos naturales de muy variada composición química, normalmente se oponen total o parcialmente y en forma

no competitiva a la acción de auxinas y giberelinas. Esta acción puede tener lugar en diferentes momentos de la actividad de estas fitohormonas, usualmente con carácter enzimático, pero raramente por su sitio activo (10). Algunos inhibidores naturales, como el ácido abscísico, inhiben el alargamiento celular inducido por auxinas (2). Dentro de este grupo de compuestos también se encuentran lactonas no saturadas y derivados de la cumarina (10).

El ivasperín (eudesmanólido 1b -hidroxialantolactona), es una lactona que produce alteraciones de radículas e hipocótilos en diferentes especies, registrándose disminución en la longitud de ambos, un menor número de divisiones celulares en meristemas

y también inhibición en el alargamiento de coleóptilos de avena (4,5,6,9). La actividad biológica de compuestos fitoquímicos como el ivasperín, indican que la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos en las moléculas, incrementan su fitotoxicidad, lo que abre un camino importante en la búsqueda de nuevos bioicidas, entre éstos los de origen natural (1,7).

Materiales y métodos

Se preparó un subextracto clorofórmico de flores de *Dinoseria salicifolia* Griseb., provenientes de plantas recolectadas del noroeste argentino. El mismo fue procesado por cromatografía en columna recolectándose 215 fracciones. Se seleccionó la fracción 54 cuyo IR mostró un importante pico a 1770 cm^{-1} que se asigna a carbonilo de lactona. La purificación posterior se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con metanol – agua en proporción 4:3. El compuesto fue identificado como ivasperín (eudesmanólido 1b - hidroxialantolactona) empleando métodos espectroscópicos (^1H -RMN y ^{13}C -RMN).

Granos de avena de la variedad Cristal, fueron colocados en hipoclorito de sodio al 1% por 10 min con la finalidad de eliminar patógenos de su superficie; luego enjuagados con abundante agua destilada y remojados por 1 h. Al cabo de este período, fueron puestos en bandejas con substrato inerte a 25°C , bajo luz roja, según técnica descrita por Mitchell y

En función de las investigaciones realizadas sobre la actividad biológica del ivasperín, se realizó el presente trabajo con el objetivo de determinar si éste compuesto actúa como inhibidor de la acción de las auxinas en el alargamiento celular, lo que contribuiría al esclarecimiento de sus posibles mecanismos de acción como producto biocida.

Livingston (8). Transcurridas 72 h se extrajeron las plántulas y se cortaron segmentos de coleóptilos de 4,4 mm de longitud, con una guillotina doble preparada para tal fin, eliminando los 2 mm apicales donde está ubicado el meristema.

Papeles de filtro se embebieron con 2 mL de soluciones clorofórmicas de 0, 300, 600 y 1000 mg L^{-1} de ivasperín, y se secaron al vacío para eliminar los restos de cloroformo. Los segmentos se colocaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con los papeles de filtro conteniendo las diferentes concentraciones de ivasperín y se agregó ácido indol acético (AIA) en dos concentraciones (0,0875 y 0,175 mg L^{-1}) y un medio base, consistente en una solución Buffer de maleato de potasio 0,0025M con un contenido de 3% de sacarosa, pH 4,5. El volumen final del medio de cultivo fue de 4 mL. Se utilizó como testigo el tratamiento que poseía solamente el medio base. Los tratamientos realizados se describen en el cuadro 1.

El uso de dos concentraciones de AIA para realizar esta prueba, tuvo en

cuenta la respuesta diferencial que se presenta en el alargamiento celular de acuerdo al material vegetal utilizado, según lo describe Filiti y Cristoferi (3). De esta manera se trató de encontrar una concentración de AIA que actúe promoviendo el alargamiento celular de los segmentos de coleóptilos de avena de la variedad Cristal.

Las cajas de Petri conteniendo 50 segmentos se incubaron en oscuridad por 16 h a 25°C, realizando 4 réplicas

de cada tratamiento en un diseño experimental de bloques al azar. Luego se determinó la longitud final de los segmentos bajo microscopio estereoscópico con un aumento de 10x. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente, realizándose un análisis de la varianza (ANOVA) para un diseño experimental de bloques al azar y confrontación de medias por la Prueba de Tukey.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a segmentos de coleóptilos de avena, como medio de incubación por 16 h.

Tratamientos	Ácido indol acético (mg L ⁻¹)	Ivasperín (mg L ⁻¹)
1*	0,00	0
2	0,00	300
3	0,00	600
4	0,00	1000
5	0,0875	0
6	0,0875	300
7	0,0875	600
8	0,0875	1000
9	0,175	0
10	0,175	300
11	0,175	600
12	0,175	1000

* medio base

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos, expresados en la longitud final de los segmentos de coleóptilos de avena, incubados por 16 h en los diferentes tratamientos, se representan en la figura 1.

Los valores obtenidos de la longitud final muestran, que en todos los casos

existió un alargamiento de los segmentos de los coleóptilos, con relación a su longitud inicial (4,4 mm). Los mayores incrementos se presentaron en los tratamientos ivasperín 0 mg L⁻¹ y AIA 0,0875 mg L⁻¹; ivasperín 300 mg L⁻¹ y AIA 0,0875 mg L⁻¹ y testigo,

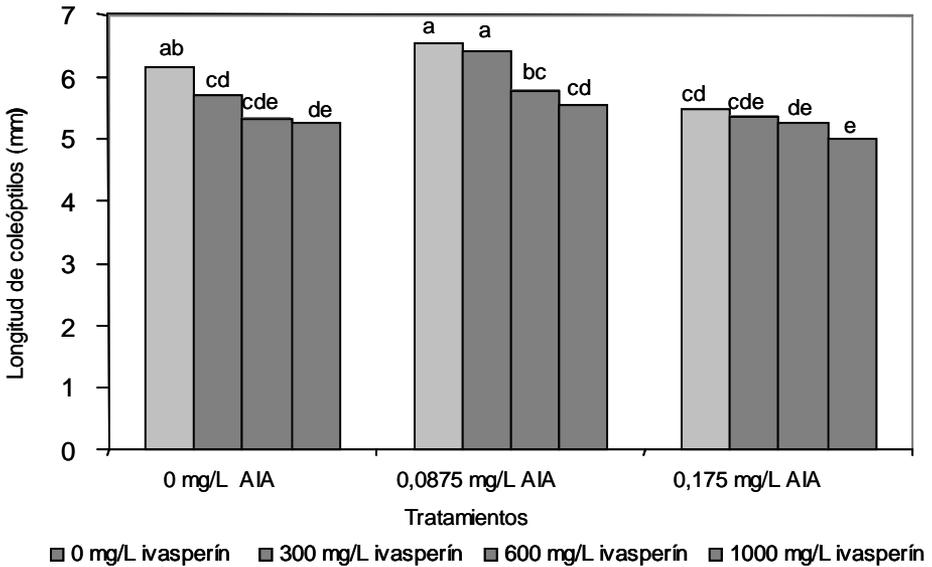


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de ácido indol acético y de ivasperín en el alargamiento de coleóptilos de avena, luego de 16 h de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Longitud inicial de coleóptilos 4,4mm.

correspondiendo valores de alargamiento del 48, 45 y 39% respectivamente. El tratamiento ivasperín 1000 mg L⁻¹ y AIA 0,175 mg L⁻¹ manifestó el menor porcentaje de alargamiento con un valor del 13%.

Es importante destacar, que son numerosos los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), en especial aquellos con bajas concentraciones de ivasperín y de AIA, con respecto a los tratamientos con elevadas concentraciones de ambos compuestos.

Se encuentra una respuesta diferente entre las concentraciones de AIA utilizadas, presentando la concentración 0,0875 mg L⁻¹ un aumento en la longitud final de los segmentos con respecto al tratamiento sin AIA; en forma opuesta, la

concentración 0,175 mg L⁻¹ de AIA, produjo un efecto inhibitorio respecto al testigo.

A pesar que la concentración de AIA de 0,175 mg L⁻¹ es la recomendada para realizar la prueba de alargamiento de coleóptilos de avena (8), en esta experiencia donde se utilizó la variedad de avena Cristal, presentó un efecto depresor, por lo que consideramos a la misma lo suficientemente alta, ya que esta respuesta es característica de las concentraciones de auxinas elevadas.

En la figura 2, puede observarse el efecto de diferentes concentraciones de ivasperín, en tratamientos con y sin AIA. Independientemente de la concentración del AIA utilizada, el aumento en las concentraciones de la lactona ensayada, produce un marcado efecto inhibitorio en el alargamiento de los segmentos;

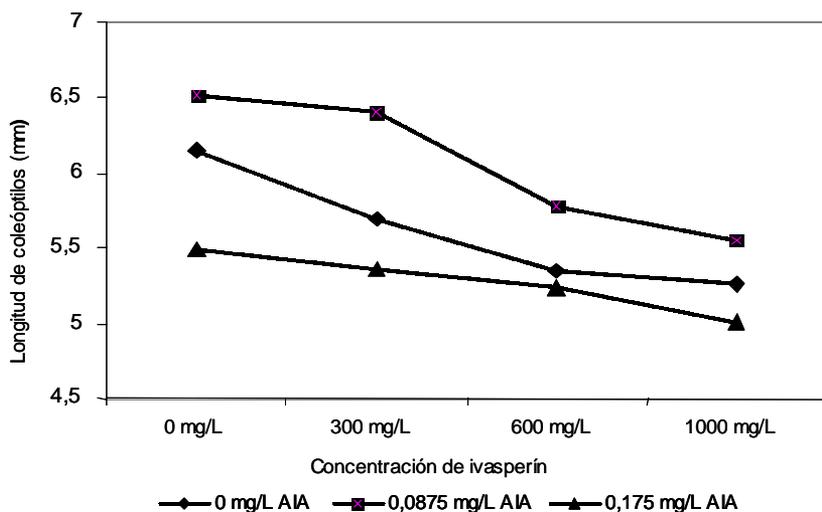


Figura 2: Efecto de las diferentes concentraciones de ivasiperín en el alargamiento de segmentos de coleóptilos de avena, incubados por 16 h en diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA). Longitud inicial de coleóptilos 4,4mm.

estos resultados son coincidentes en el caso de la curva considerada testigo (sin AIA y con diferentes concentraciones de

ivasiperín), con los enunciados anteriormente por Gianfrancisco *et al* (6).

Conclusiones

El ivasiperin produjo una disminución en el alargamiento celular de segmentos de coleóptilos de avena, con un efecto mayor a medida que la concentración se incrementa desde 300 a 1000 mg L⁻¹. Los resultados indican un mayor alargamiento, cuando se aplica al medio base AIA 0,0875 mg L⁻¹ para todas las concentraciones de

ivasiperín utilizadas, con relación a los tratamientos sin AIA. Cuando la concentración de AIA fue 0,175 mg L⁻¹, se produjo un menor alargamiento respecto al testigo, en todas las concentraciones de la lactona presentes en el medio de incubación, indicando un efecto inhibitor en altas concentraciones.

Literatura citada

1. Baruah, N. C., J. C. Sarma, N. C. Barua, S. Sarma y R. P. Sharma. 1994. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactone and a flavones from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* 36: 29-36.
2. Evans, M. L. 1984. Functions of hormones at the cellular level of organization. p. 23-79. In: *Hormonal regulation of development II. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 10* Edited by T. K. Scott. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.
3. Filiti, N. G. y G. Cristoferi. 1977. Reattività dei coleoptili di alcune cultivars italiane de frumento alle sostanze auxino-simili ed all'acido abscissico con el "segment straight-growth test". *Giornale Botanico Italiano* 11:135-144.
4. Gianfrancisco, S., A. Pastoriza y E. Riscalá. 1999a. Phytotoxic action of an extract of *Dinoseris salicifolia* Griseb. in the germination of seed of *Cichorium intybus* L. *Biocell* 23:8.
5. Gianfrancisco, S., A. Pastoriza y E. Riscalá. 1999b. Efecto de un metabolito aislado de *Dinoseris salicifolia* Griseb sobre radículas de achicoria. En: *Actas del XXII Congreso Argentino de Horticultura*. Octubre. Tucumán. Argentina. p. 1-4.
6. Gianfrancisco, S., A. Pastoriza y E. Riscalá. 2000. Inhibitory effect of the ivasperin in the lengthening of ost coleoptile segments. *Biocell* 24:150.
7. Macías, F. A., J. M. G. Molinillo, A. Torres; R. M. Varela y D. Castellano. 1997. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry* 45:683-687.
8. Mitchell, J. W. y G. A. Livigston. 1973. Métodos para el estudio de hormonas vegetales y sustancias reguladoras del crecimiento. Editorial Trillas. Mexico. p. 36-38.
9. Pastoriza, A.; E. Riscalá y S. Gianfrancisco. 2000. An eudesmanolide isolated from *Hyaloseris salicifolia* Griseb with herbicidal activity in *Brassica campestris* L. In: *Abstracts of the III International Weed Science Congress*. p.34-35. Junio. Foz de Iguazú, Brasil.
10. Sivori, E. M., E. R. Montaldi y O. H. Caso. 1980. Reguladores del crecimiento. p. 441-534. En: *Fisiología Vegetal*. Editorial Hemisferio Sur.