

Efecto alelopático del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek en semillas de *Allium fistulosum* L. y *Lactuca sativa* L.

Morel, S.¹; Gayozo, E.²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo - Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo - Paraguay.

E-mail del autor: sandysandy1396@gmail.com

Efecto alelopático del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek en semillas de *Allium fistulosum* L. y *Lactuca sativa* L. Escasos estudios indican que *Maytenus ilicifolia* podría ejercer efecto alelopático. Este estudio fue realizado para evaluar los efectos del extracto etanólico de *M. ilicifolia* sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de *Lactuca sativa* y *Allium fistulosum*. Se llevó a cabo un estudio experimental analítico con diseño de bloques completamente al azar, se preparó el extracto etanólico de hojas de *M. ilicifolia* a concentraciones de 10, 1 y 0,1 mg.mL⁻¹. Los ensayos se realizaron por triplicados utilizando 432 semillas de cada especie depositadas en placas de Petri con papel absorbente estéril, humedecidas con 5 ml de cada solución, y agua destilada como testigo, incubadas a 28° C. Los datos obtenidos fueron analizados con test de ANOVA y Kruskal-Wallis. Los resultados sugieren efecto alelopático negativo sobre la germinación de *L. sativa* y *A. fistulosum* a la concentración de 10 mg.mL⁻¹ e inhibidor del crecimiento radicular a concentraciones de 1 y 10 mg.mL⁻¹.

Palabras claves: *Maytenus ilicifolia*, alelopatía, germinación, radícula, *Allium fistulosum*, *Lactuca sativa*

Allelopathic effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek ethanolic extract on seeds of *Allium fistulosum* L. and *Lactuca sativa* L. Few studies indicate *Maytenus ilicifolia* could exert allelopathic effect. This study was conducted to evaluate the effects of the ethanolic extract of *M. ilicifolia* on germination and radicle growth of *Lactuca sativa* and *Allium fistulosum* seeds. An analytical experimental study with a completely random block design was carried out, for this the ethanolic extract of *M. ilicifolia* leaves was made at concentrations of 10, 1 and 0,1 mg.mL⁻¹. The tests were carried out in triplicates using a total of 432 seeds of each species deposited in Petri dishes with sterile absorbent paper, moistened with 5 ml of each solution, and distilled water as control, incubated at 28°C. The data obtained were analyzed with ANOVA and Kruskal-Wallis tests. The results suggest a negative allelopathic effect on *L. sativa* and *A. fistulosum* germination at a concentration of 10 mg.mL⁻¹ and root growth inhibitor at concentrations of 1 and 10 mg.mL⁻¹.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*, allelopathy, germination, radicle, *Allium fistulosum*, *Lactuca sativa*

INTRODUCCIÓN

El término alelopatía se refiere a interacciones bioquímicas entre todo tipo de plantas, incluyendo microorganismos

(Molisch, 1937; Asaduzzaman et al. 2010). Estas reacciones naturales tienen múltiples efectos, que van desde la inhibición o estimulación de los procesos de crecimiento de las plantas vecinas, hasta la inhibición de

Steviana, Vol. 10 (2), 2018 pp. 24 – 31

Original recibido el 8 de octubre de 2018

Aceptado el 10 de diciembre de 2018

la germinación de semillas (Blanco, 2006). Aparentemente, la mayoría, si no todos, los compuestos orgánicos que son inhibidores en algunas concentraciones son estimulantes para los mismos procesos en concentraciones muy pequeñas (Rice, 1984). Las condiciones fisiológicas influyen en estos aleloquímicos, tales como las etapas nutricionales y fenológicas, y las condiciones del ambiente donde se cultivan las plantas (Cecchin et al., 2017). *Maytenus ilicifolia*, también conocida como “cangorosa”, es una planta originaria de Sudamérica, perteneciente a la familia Celastraceae. Según Cirio et al. (2003), las plantas de *M. ilicifolia* crecen naturalmente y se desarrollan en ambiente sombreado, dispersas en los bosques, en suelos con alto contenido de materia orgánica. Es comúnmente utilizada como planta medicinal debido a que posee acción antiulcerogénica por presencia de flavonoides en la composición, y acción antioxidante por presencia de polifenoles (Da Silva et al., 2012). Escasos estudios indican que podría ejercer efecto alelopático (Dias et al., 2005; Mendes et al., 2010).

La utilización de agentes alelopáticos, como una herramienta de manejo en los cultivos, puede ser uno de los usos más prácticos y aplicables de la alelopatía en los agroecosistemas (Blanco, 2006). La alelopatía puede ofrecer nuevas sustancias químicas con propiedades herbicidas menos perjudiciales para el medio ambiente y el hombre que los sintéticos en uso en la actual agricultura (Inoue et al., 2010). Deben llevarse a cabo estudios acerca de los factores que influyen en la producción y liberación de aleloquímicos con el fin de promover la alelopatía como un recurso de control no convencional para el manejo de plagas en sistemas agrícolas (Kobayashi & Ikato-Noguchi, 2015).

Esta investigación fue realizada con el fin de evaluar los efectos del extracto etanólico de *M. ilicifolia* a diferentes concentraciones sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de *Lactuca sativa* y *Allium fistulosum* mediante ensayos *in vitro* a modo de generar los primeros datos para su posterior ensayo *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto etanólico de *Maytenus ilicifolia*

Los especímenes vegetales de *M. ilicifolia* fueron proporcionados por el Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN-UNA) e identificados taxonómicamente en el Laboratorio de Recursos Vegetales (LAREV) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Las hojas fueron secadas sin exposición directa al sol, así como al flujo de aire a modo de evitar la oxidación de los compuestos (Hostettmann et al., 2008). Una vez secas fueron trituradas con ayuda de un molino manual, el producto fue tamizado con ayuda de una malla de 0,05 mm a modo de obtener un triturado homogéneo. Luego se pesó una cantidad de 500 gramos con ayuda de una balanza de precisión y se mezcló con el solvente (Etanol 98°) en una proporción de 3:50 (Singh et al., 2011). La solución se dejó reposar por 30 días con agitación diaria, luego se filtró con ayuda de un equipo filtrador a modo de separar los residuos del sobrenadante (Singh et al., 2011). El filtrado fue sometido a calentamiento y agitación constante a temperatura de 80° C con el fin de evaporar el solvente empleado y obtener el extracto crudo. Se obtuvo 15 gramos del extracto crudo con el cual se realizaron las concentraciones

Morel, S; Gayozo, E. Efecto alelopático de *Maytenus ilicifolia* en semillas de *Allium fistulosum* y *Lactuca sativa*

finales de 0,1 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹ y 10 mg.mL⁻¹ para ser utilizadas en los ensayos.

Desinfección de semillas de *Lactuca sativa* y *Allium fistulosum*

Las semillas de *L. sativa* y *A. fistulosum* fueron obtenidas de un proveedor comercial. Se lavaron en un Erlenmeyer de 100 mL con etanol al 70% durante 3 minutos, luego se desinfectaron con Hipoclorito de sodio 1:3 (v/v) durante 2 minutos, se realizaron 2 últimos lavados con agua destilada durante 2 minutos. Luego de esto, se retiraron las semillas y se las dejó secar sobre papel absorbente previamente esterilizado.

Ensayos de germinación y medición de radículas de *L. sativa* y *A. fistulosum*

Previamente se limpiaron 24 placas de Petri con etanol al 70% y luz UV durante una hora a modo de disminuir la carga de microorganismos y contaminantes. Luego se colocaron papeles absorbentes previamente autoclavados (121°C y 1 atm de presión por 15 minutos). Se trataron un total de 144 semillas por especie, para ello se humedecieron los papeles absorbentes con 5 mL de cada una de las soluciones acuosas del extracto etanólico de *M. ilicifolia* (0,1 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹ y 10 mg.mL⁻¹) y agua destilada como testigo, estos tratamientos se realizaron por triplicados. Una vez culminado fueron almacenadas en una incubadora a una temperatura constante de 28° ± 2° C. Se realizaron verificaciones diarias

de la germinación y el conteo final de las semillas y la medición de la longitud de radículas de *L. sativa* y *A. fistulosum* se realizaron a los seis y once días luego del tratamiento respectivamente. Las mediciones de las radículas se realizaron con ayuda de un escalímetro de precisión 0,005 mm.

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante los tests estadísticos de ANOVA y Kruskal-Wallis con 95% de confianza y con previa comprobación de supuestos. Como análisis post-hoc se empleó el test de Tukey y de Dunn (Dunn, 1964). Para ello se empleó el paquete estadístico Past versión 3.00 (Hammer et al., 2001). Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA (Swift, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los tratamientos de las semillas de *L. sativa*, demostraron un porcentaje de germinación del 100 % al ser tratadas con agua destilada. Con la concentración 0,1 mg.mL⁻¹ de la solución acuosa del extracto etanólico de *M. ilicifolia* revelaron el 95,37 % de germinación; al utilizar la concentración 1 mg.mL⁻¹ el porcentaje de germinación fue del 97,22 %, y con la concentración 10

Tabla 1: Porcentaje de germinación de semillas de *Lactuca sativa* y *Allium fistulosum*.

	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium fistulosum</i>
Agua destilada	100	64,81
0,1 mg.mL ⁻¹	95,37	72,22
1 mg.mL ⁻¹	97,22	61,11
10 mg.mL ⁻¹	10,19*	54,63*

*p<0,05

Tabla 2: Promedio de longitud de radículas de semillas germinadas de *Lactuca sativa* y *Allium fistulosum*.

	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium fistulosum</i>
Agua destilada	16,30	53,69
0,1 mg.mL ⁻¹	18,12	54,33
1 mg.mL ⁻¹	14,61*	51,84
10 mg.mL ⁻¹	11,00*	37,39*

*p<0,05

mg.mL⁻¹ el porcentaje de germinación fue el 10,19%. Se observó una diferencia considerable entre este último porcentaje con respecto al 100 % de germinación correspondiente al testigo (Tabla 1, Fig. 1A.)

Así también con las semillas de *A. fistulosum*, se obtuvo un porcentaje de germinación del 64,81 % en el tratamiento con agua destilada como control. El tratamiento con el extracto de *M. ilicifolia* a la concentración 0,1 mg.mL⁻¹ demostró un 72,22 % de germinación; al utilizar la concentración 1 mg.mL⁻¹ el porcentaje de germinación fue del 61,11 %, y con la concentración 10 mg.mL⁻¹ 54,63 % de germinación. En este caso, se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de

germinación de las semillas tratadas con la concentración 0,1 mg.mL⁻¹ y el de las semillas tratadas con la concentración 10 mg.mL⁻¹ (Tabla 1, Fig. 1B.)

Según Dias et al. (2005), el extracto etanólico de *M. ilicifolia* no posee influencia alguna en la germinación de semillas de *L. sativa*. En contraste, según lo observado por Chaves et al. (2014), el extracto acuoso de *M. ilicifolia* en las concentraciones de 85% y 100% causó una mayor inhibición en la germinación de las semillas en comparación con el testigo.

El valor promedio obtenido para las semillas de *L. sativa* germinadas en el tratamiento con agua destilada fue de 16,30 mm. El tratamiento con la concentración

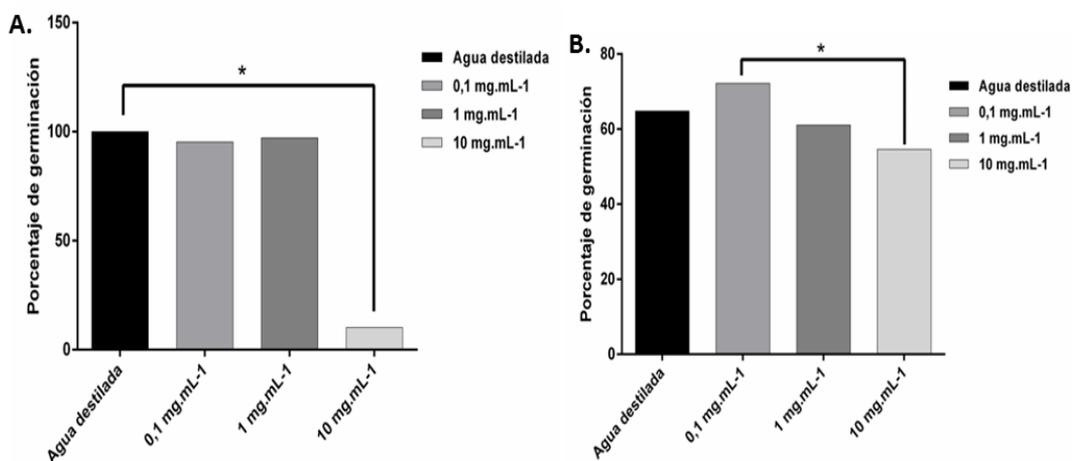


Fig. 1: Porcentaje de germinación de semillas. **A.** *Lactuca sativa* **B.** *Allium fistulosum*.

Morel, S; Gayozo, E. Efecto alelopático de *Maytenus ilicifolia* en semillas de *Allium fistulosum* y *Lactuca sativa*

0,1 mg.mL⁻¹ del extracto reveló un valor promedio de 18,12 mm. Con la concentración 1 mg.mL⁻¹ el promedio fue de 14,61 mm, y con la concentración 10 mg.mL⁻¹ se obtuvo un promedio de 11,00 mm. Estos dos últimos tratamientos presentaron diferencias considerables respecto al promedio de longitud de radículas obtenido en el tratamiento con el extracto de *M. ilicifolia* a 0,1 mg.mL⁻¹ (Tabla 2, Fig. 2A.). Las semillas germinadas de *A. fistulosum* en el tratamiento con agua destilada presentaron un promedio de longitud de radícula de 53,69 mm. En el tratamiento con la concentración 0,1 mg.mL⁻¹, se obtuvo una longitud radicular promedio de 54,33 mm. Con la concentración 1 mg.mL⁻¹ el promedio de longitud radicular fue de 51,84 mm, sin embargo, con la concentración 10 mg.mL⁻¹, el promedio de longitud radicular fue menor siendo este de 37,39 mm. Este último tratamiento evidenció disminuciones significativas en cuanto a la longitud en comparación a los demás crecimientos radiculares de los otros tratamientos (Fig. 2B). Dias et al. (2005) evidenciaron la influencia inhibitoria del extracto etanólico de hojas de

M. ilicifolia en el crecimiento de radículas de *L. sativa*. Los tratamientos con extracto acuoso y extracto etanólico de *Maytenus rigida* realizados por Mendes et al. (2010) sobre el meristema radicular de *Allium cepa* dieron como resultado un aumento en la división celular; más importante aún, esta división se produjo sin provocar anomalías cromosómicas.

El potencial alelopático de las hojas de *M. ilicifolia* puede deberse a la presencia de saponinas, taninos y flavonas, los cuales ejercen dicha actividad sobre semillas de otras especies. Un análisis cualitativo de fitoquímicos realizado por Machado et al. (2006) mostró que *M. ilicifolia* contiene en sus hojas saponinas, taninos y flavonas. La presencia de estos compuestos podría explicar el potencial alelopático de las hojas de *M. ilicifolia*, ya que los mismos ejercen dicha actividad sobre semillas de otras especies. Entre los compuestos polifenólicos presentes en las hojas predominan, entre otros, taninos hidrolizables (ácido tánico), taninos condensados en las hojas (catequina, epicatequina, 4-O-metilepigalocatequina y su epímero 4'-O-metil-

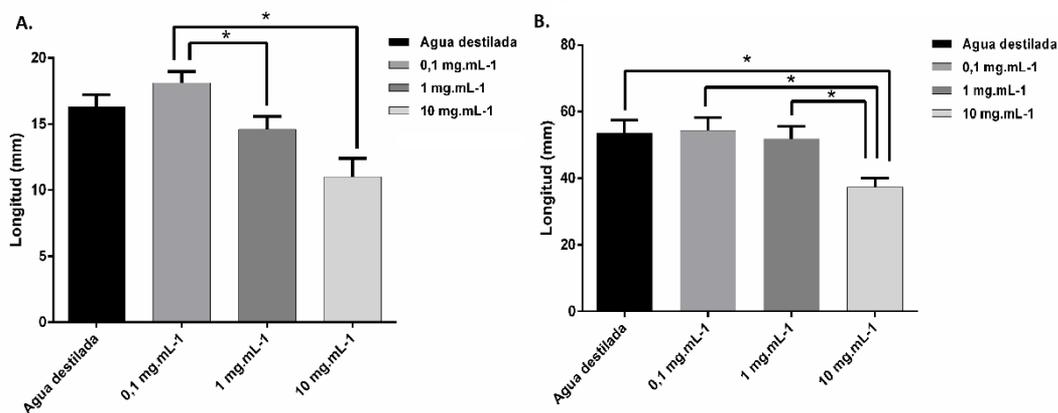


Fig. 2: Promedio de longitudes de radícula de semillas tratadas con extracto de *Maytenus ilicifolia*. A. *Lactuca sativa* B. *Allium fistulosum*.

entgalocatequina (Silva y Récio, 1992; Soares et al., 2004; Pessuto, 2006). Un análisis cuantitativo de los glucósidos flavonoides de extractos metanólicos de *M. ilicifolia* mediante HPLC realizado por Leite et al. (2001), reveló a estos compuestos como los principales constituyentes del extracto. De acuerdo con Silva (2004), las saponinas, que son terpenoides glicosilados, son sustancias involucradas directamente en efectos alelopáticos. Las saponinas actúan reduciendo la frecuencia respiratoria mediante la reducción de la difusión de oxígeno a través de la cubierta de la semilla, lo que inhibe el proceso de germinación y el crecimiento de la planta (Maraschin-Silva & Águila 2005). Los ácidos tánicos son capaces de inhibir las actividades de la peroxidasa, catalasa y celulosa (Zhao-Hui et al., 2010). Desafortunadamente, el mecanismo preciso por el cual los flavonoides participan en la alelopatía es aún desconocido (Mierziak et al., 2014). Las formas potenciales en las que pueden influir en la alelopatía pueden incluir la inhibición del crecimiento celular, alteraciones en la producción de ATP y dificultando el buen funcionamiento de las auxinas (Berhow & Vaughn, 1999).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos evidenciaron un bajo porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativa* y *A. fistulosum* en el tratamiento con la concentración de 10 mg.mL⁻¹, también se observó menor crecimiento radicular de *L. sativa* con los tratamientos de 1 y 10 mg.mL⁻¹, sin embargo con semillas de *A. fistulosum* se observó menor crecimiento radicular en el tratamiento con la concentración de 10 mg.mL⁻¹. Estos resultados sugieren un efecto

alelopático negativo sobre la germinación de las semillas de *L. sativa* y *A. fistulosum* a la concentración de 10 mg.mL⁻¹ e inhibidor del crecimiento radicular a las concentraciones de 1 y 10 mg.mL⁻¹. Se recomienda repetir los ensayos *in vitro* ampliando el número de especies vegetales de importancia económica, empleando una extracción acuosa y una acetónica a modo de separar los metabolitos por afinidad química. Además, es recomendable continuar con ensayos *in vivo* a mini escala a modo de reconfirmar los resultados obtenidos *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asaduzzaman, M., Mahbub, M., & Sultana, S. (2010). Allelopathy and allelochemicals in rice weed management. *Bangladesh Research Publications Journal* 4 (1): 1-14.
- Berhow, M. A. & Vaughn, S.F. (1999). *Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology* In Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemical Interaction; Dakshini, K.M.M., Foy, C.L., Eds.; CRC Press LLC: Florida, FL, USA, pp. 423–438.
- Blanco, Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos tropicales* 27 (3): 5-16.
- Cecchin K., Favaretto, A., Scheffer-Basso., S.M. Bertol., C.D., & Chini, S.O. (2017). Allelopathy and Allelochemicals of *Eragrostis plana* (Poaceae) and its Relation with Phenology and Nitrogen Fertilization. *Planta Daninha*. 35:1-12.
DOI:10.1590/S0100-8358201735010-0028

Morel, S; Gayozo, E. Efecto alelopático de *Maytenus ilicifolia* en semillas de *Allium fistulosum* y *Lactuca sativa*

- Cirio, G. M., Doni Filho, L., Miguel, M. D., Miguel, O. G., & Zanin, S. M. W. (2003). Inter-relação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart. Ex. Reiss (espinheira-santa) como insumo para a indústria farmacêutica. *Visão Acadêmica, Curitiba* 4 (2): 67-76.
- Da Silva, N. K., & Xavier, F. B. (2012). Atividade antiulcerogênica e potencial antioxidante da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). *Revista Uningá* 32 (1): 1-6
- Dias, J. F. G., Círio, G. M., Miguel, M. D., Miguel, O. G. (2005). Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(3): 220-223.
- Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6:241-252.
- Hammer, R., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis—Palaeontol. *Electron* 4: 9pp.
- Hostettmann, K., Gupta, M. P., Marston, A. & E. Ferreira Quiroz. (2008). *Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos*. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. Colombia. 234p.
- Inoue, M.H., Santana, D.C., Souza Filho, A.P.S., Possamai, A.C.S., Silva, L.E.5, Pereira, M.J.B. & Pereira, K.M. (2010). Allelopathic Potential of *Annona crassiflora*: Effects on Weeds. *Planta Daninha, Viçosa-MG* 28(3): 489-498.
- Kobayashi A. & Kato-Noguchi, H. (2015). The seasonal variations of allelopathic activity and allelopathic substances in *Brachiaria brizantha*. *Botanical Studies*. 56:1-7. DOI: 10.1186/s40529-015-0105-7. Epub 2015 Sep 19.
- Leite, J. P. V.; Rastrelli, L.; Romussi, G.; Oliveira, A. B.; Vilegas, J. H.; Vilegas, W.; Pizza, C. (2001). Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8):3796-801
- Machado, S. A., Vesz, L., Peixoto, D., de Brum, C. F., Bobrowski, V. L., & Gomes, B. H. (2006). Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss). *Biol. Saúde, Ponta Grossa*, 11 (3/4): 7-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v11i3.415>
- Maraschin-Silva F., & Aquila M. E. A. (2005). Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Iheringia* 60:91-98
- Mendes, S., Andrade, J.A., Xavier, M. A., Secundo Junior, J. A., Pantaleão, S. M., Estevam, C. S., Garcia, C.A. B., & Ferrari, S. B. (2012). Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia bitorstris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22(1): 76-81. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000180>
- Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules* 19 (10): 16240-16265. DOI: 10.3390/molecules191016240.

- Molisch, H., (1937). *Der Einfluss einer Pflanze auf die Anderd-Allelopathie*. Fischer, Jena, Germany.
- Pessuto, M. B. (2006). Análise fitoquímica de extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss. e avaliação do potencial antioxidante. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá.
- Rice, E. L. (1984). *Allelopathy*. Academic Press. p. 1.
- Silva, C.; Récio, R. (1992). Coleta e avaliação dos compostos fitoquímicos da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*). Comunicação al XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil (Curitiba, Brasil).
- Silva, F. M. (2004). Verificação da eficácia dos bioensaios com extratos aquosos no diagnóstico de potencial alelopático: contribuição ao estudo de espécies nativas brasileiras. Porto Alegre,. 142p. Tese (Mestrado em Botânica) – UFRGS.
- Singh, K.P.; Dwevedi, A.K. y G. Dhakre. (2011). Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 2(3): 398–401.
- Soares, L.; Oliveira, A.; Ortega, G.; Petrovick, P. (2004). Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36:787-790.
- Swift, M. L. (1997). GraphPad Prism, Data Analysis, and Scientific Graphing. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 37(2).
- Zhao-Hui L., Qiang W., Xiao R., Cun-De P., & De-An J. (2010). Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*. 15(12), 8933-8952. DOI: 10.3390/molecules1512893