

EFFECTO DE EXUDADOS DE AVENILLA (*Avena fatua* L.) SOBRE PLANTULAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) PRIMAVERAL¹

Effect of wild oat (*Avena fatua* L.) root exudates on seedlings of spring wheat (*Triticum aestivum* L.)

Francisco Pérez C.² y Juan Ormeño N.³

SUMMARY

Root exudates from the undisturbed root system of wild oat (*Avena fatua* L.) seedlings were collected by a modification of the Tang & Young method. Exudates inhibited root and coleoptile growth of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Scopoletin, coumarin, p-hydroxibenzoic and vanillic acid were identified from the root exudates by HPLC being scopoletin the main allelochemical determined.

Key words: allelopathy, wild oats, scopoletin, root exudates.

INTRODUCCION

La avenilla (*Avena fatua* L.) es una de las principales malezas gramíneas anuales de los cereales y, en particular, la de mayor importancia económica del cultivo del trigo (Sharma y Vanden Born, 1978). Las infestaciones de avenilla normalmente resultan en pérdidas considerables en las sementeras de trigo (Bell y Nalewaja, 1968; Carlson y Hill, 1985; Martin, Field y Field, 1987; Martin, Cullis y McNamara, 1987). Las bajas de rendimiento de grano han sido normalmente explicadas por competencia por algún factor de producción como luz, agua, nutrimentos, y espacio (Martin y otros, 1987b). Recientemente, sin embargo, se ha sugerido que la existencia de fenómenos alelopáticos pudiesen estar involucrados en estas pérdidas de rendimiento causadas por esta especie (Tinnin y Muller, 1972; Schumacher y otros, 1983).

La secreción de un aleloquímico por una planta en cantidades suficientes como para iniciar algún tipo de respuesta de la planta receptora sigue siendo todavía el problema central que presentan los estudios de alelopatía en el mundo (Rice, 1984). Estos aleloquímicos podrían ser liberados activamente por las plantas

al entorno, ya sea por volatilización, exudados radicales, o bien por descomposición y percolación de los residuos (Schumacher y otros, 1983; Tang, 1986).

El objetivo del presente trabajo fue medir el efecto de exudados obtenidos de raíces de avenilla no disturbadas en diferentes estados de crecimiento de la maleza sobre plántulas de trigo primavera, cv Millaleu-INIA.

MATERIALES Y METODOS

Semillas. Las semillas de avenilla se obtuvieron de recolecciones de campo realizadas durante la temporada 1986/87 en la Estación Experimental Quilamapu, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Chillán, Chile. Las semillas se guardaron en bolsas de papel, sobre estantes, donde se mantuvieron a temperatura ambiente por dos años. Al momento de realizar los bioensayos estas semillas estaban no dormantes y tenían un porcentaje de germinación superior al 95%. Por otra parte, las semillas de trigo primavera cv. Millaleu-INIA fueron obtenidas en la Estación Experimental La Platina (INIA), Santiago, Chile.

Recolección de exudados de raíces. Las semillas de avenilla se hicieron germinar en placas Petri con papel filtro humedecido Whatman N° 1. Inmediatamente después de la emergencia de la radícula, estas semillas se plantaron en botellas colectoras de exudados similares a las descritas por Tang y Young (1982). Los colectores de exudados consistieron en botellas de vidrio oscuro de 5 L de capacidad, con la parte inferior cortada. Colocada en forma invertida, la botella se llenó con una capa de 6 cm de vermiculita. En la salida inferior se instaló una columna de vidrio conteniendo la resina Amberlite XAD-4, la cual se conectó a un sistema

¹Recepción de originales: 20 de abril de 1990.

Parte del trabajo presentado al XXXX Congreso de la Sociedad Agronómica de Chile, Valparaíso, Chile, 25 al 27 de octubre de 1989. Los autores agradecen la colaboración técnica de la Srta. Patricia Muñoz y el apoyo financiero de las siguientes instituciones: International Foundation for Science, International Program in the Chemical Science y Agency for International Development.

²Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

³Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

de tuberías de vidrio que conducía a la parte superior de la botella de vidrio. La circulación del exudado se realizó a través de un sistema de bombeo con aire comprimido. La separación de los compuestos orgánicos de los exudados radicales se hizo haciendo circular la solución acuosa a través de la resina en la columna, los que luego fueron removidos desde la resina usando un solvente orgánico. Previamente a cada uso, el sistema fue esterilizado y todo el material transparente fue recubierto con papel de aluminio. Todo el sistema permaneció en una cámara de crecimiento mantenida a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 5$ y a un fotoperíodo de 12 día:12 noche, usando una mezcla de luces incandescentes y fluorescentes. En cada botella se sembraron 30 plántulas de avenilla las que se regaron con agua destilada a través de un sistema de goteo con un gasto de 15 ml/min hasta que las plántulas alcanzaron la primera hoja de desarrollo. La columna fue luego separada de las botellas y reemplazada por una nueva y las plántulas se comenzaron a regar, esta vez con una solución Hoagland diluida 1:10 con agua. Este mismo proceso se repitió hasta que las plantas alcanzaron la cuarta hoja de desarrollo. La recolección de exudados se realizó entre la emergencia y el estado de primera hoja, entre el de primera hoja y segunda, entre el de segunda y tercera y entre el de tercera y cuarta, respectivamente. También se realizó una recolección continua entre la emergencia y la cuarta hoja de desarrollo de las plántulas. Después de cada período de colección de exudados, la columna con resina fue lavada con 10 ml de H_2O destilada y luego enjuagada con 100 ml de metanol (MeOH). Esta solución de MeOH fue luego evaporada hasta sequedad a presión reducida y el remanente fue redisoluto en 1 ml de MeOH el que luego se usó para los bioensayos y los análisis con el HPLC. En cada experimento de recolección de exudados radicales de avenilla, los controles consistieron en botellas con vermiculita pero sin plántulas y sometidas al mismo régimen que aquellas con plántulas de la maleza.

Bioensayos. Todos los bioensayos se realizaron en placas Petri esterilizadas y que tenían un disco de papel filtro Whatman N° 1. Al papel filtro se le agregó diferentes volúmenes de los exudados de raíces de avenilla disueltos en MeOH. Después que el solvente se evaporó del papel, se agregaron 3 ml de H_2O destilada, para luego poner 10 semillas de trigo sobre el papel en cada placa Petri. Las muestras de los controles sin avenilla se obtuvieron y agregaron a las placas de manera similar. Se realizaron mediciones de longitud de radícula y coleoptilo después de 72 hr de incubación en la oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Cada bioensayo se realizó en triplicado y para las comparaciones entre cada uno de los tratamientos, diferentes volúmenes de exudados, y los respectivos controles sin exudados de avenilla, se utilizó la Prueba de 't' ($P \leq 0,05$).

Análisis con HPLC. Los análisis cromatográficos se realizaron con un HPLC Knauer equipado con dos bombas tipo 364, cámara de mezclas, detector μv -visible variable y un paquete software de HPLC conectado a un computador personal. La separación de los compuestos fue realizada usando una columna Nucleosil 100 C-18 (4 x 120 mm) con tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil fue un gradiente proporcional de H_2O (pH 3,0):MeOH, 80:20 a 50:50, durante 15 min y luego H_2O :MeOH, 50:50 por otros 5 min. El flujo fue de 1,2 ml/min y las soluciones se analizaron tanto a 254 nm como a 340 nm. Previo a la inyección, las muestras se pasaron a través de un filtro de 0,45 μm usando, para este efecto, un volumen de 20 μl . La identificación de los compuestos en los exudados de raíces de avenilla se llevó a cabo comparando los tiempos de retención en el Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) de los compuestos desconocidos en los exudados de avenillas, con aquellos de los compuestos estándares puros.

Compuestos químicos. Los compuestos estándares utilizados, adquiridos a Sigma Productos Químicos, se presentan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Tiempos de retención de los estándares y de los exudados de raíces de plántulas de avenilla (*Avena fatua* L.) recolectados usando el HPLC

TABLE 1. HPLC retention time of standards and exudates of wild oat (*Avena fatua* L.) seedlings

Estándares	Tiempo de retención (min:seg)	Número de exudado	Tiempo de retención (min:seg)
Acido protocatéquico	3:19		-
Acido p-hidroxibenzoico	5:15	1	5:18
Acido vanilínico	6:30	2	6:34
Acido cafeico	7:08		-
Acido siríngico	7:33		-
Umbelliferona	9:13	3*	8:16
		4**	9:33
Acido p-cumárico	10:01		-
Escopoletina	10:11	5	10:08
Acido salicílico	10:51		-
Acido ferúlico	11:07		-
Cumarina	12:01	6	11:54
Acido o-cumárico	12:43		-
		7*	13:02
Acido cinnámico	16:36		-

*Compuestos no identificados.

**Contaminación microorganismos.

RESULTADOS

Efecto de los exudados. Los exudados de raíces recolectados entre la emergencia y la primera hoja de desarrollo de la avenilla, inhibieron significativamente el crecimiento de la radícula y el coleoptilo del trigo. En ambos casos (Figuras 1 y 2) el grado de inhibición dependió del volumen de exudados utilizado. La elongación de la radícula fue más afectada que la del coleoptilo. Menores niveles de inhibición fueron

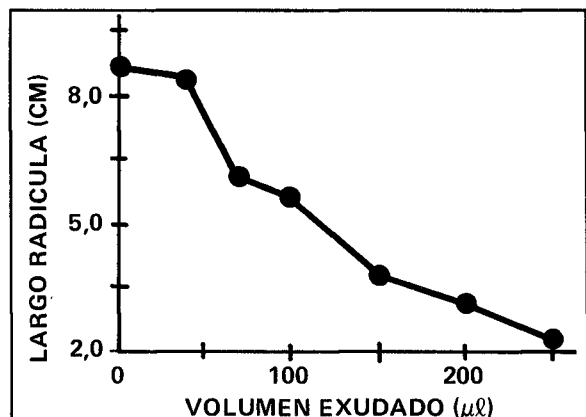


FIGURA 1. Inhibición del crecimiento de la radícula de plántulas de trigo producido por exudados radicales de avenilla recolectados entre la emergencia y la primera hoja, después de 72 hr de incubación en la oscuridad a $21^{\circ}\text{C} \pm 3$ en relación al control.

FIGURE 1. Inhibition of root growth of spring wheat by root exudates of wild oats collected between emergence and first leaf stage, after 72 hr incubation in the dark at $21^{\circ}\text{C} \pm 3$ relative to control.

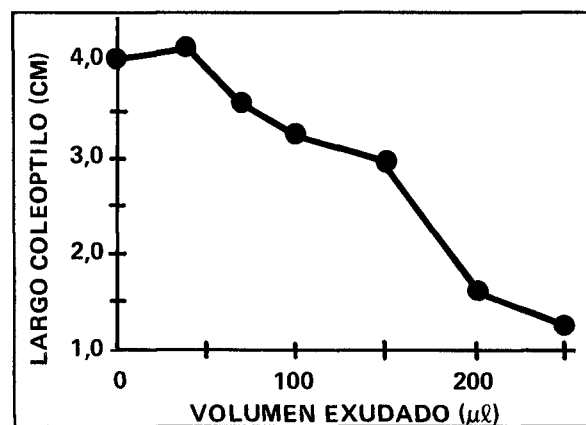


FIGURA 2. Inhibición del crecimiento del coleoptilo de plántulas de trigo producido por exudados radicales de avenilla recolectados entre la emergencia y la primera hoja, después de 72 hr de incubación en la oscuridad a $21^{\circ}\text{C} \pm 3$.

FIGURE 2. Inhibition of coleoptile growth of spring wheat by root exudates of wild oats collected between emergence and first leaf stage, after 72 hr of incubation in the dark at $21^{\circ}\text{C} \pm 3$.

observados con exudados colectados entre la primera y la segunda hoja y la tercera y cuarta hoja de desarrollo de la avenilla, que aquellos obtenidos con los mismos volúmenes (100 ml) de exudados colectados en forma

continua desde la primera hasta la cuarta hoja (Figura 3). La mayor inhibición observada con los exudados recolectados en forma continua se podría deber a una sumatoria de los efectos inhibitorios de las recolecciones realizadas parcialmente. Esto indicaría que, a medida que aumenta el tiempo de recolección aumenta también la toxicidad de los exudados y esto, probablemente, se debería a una acumulación de aleloquímicos en los exudados radiculares.

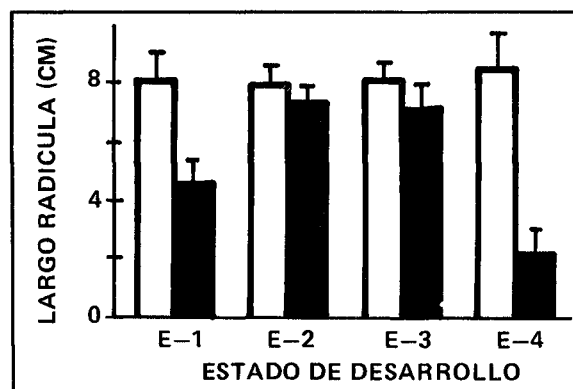


FIGURA 3. Inhibición del crecimiento radicular de plántulas de trigo primaveral producido por 100 µl de exudados radicales de avenilla y recolectados en diferentes estados de crecimiento (E = emergencia: 1, 2, 3, 4 = primera, segunda, tercera y cuarta hoja de desarrollo, respectivamente), después de 72 hr de incubación en la oscuridad a $21^{\circ}\text{C} \pm 3$. Barras negras, con exudados radiculares; barras blancas, control sin plántulas de avenilla.

FIGURE 3. Inhibition of root growth of spring wheat by 100 µl of root exudates of wild oats collected between different developmental stages of the plant (E = emergence: 1, 2, 3, 4 = first, second, third and fourth leaf stages, respectively), after 72 hr incubation in the dark at $21^{\circ}\text{C} \pm 3$. Dark bars: root exudates; Light bars: control collected without plants in the pot.

Separación, identificación y cuantificación de los aleloquímicos en los exudados de raíces de avenilla. En la Figura 4-a se comparan los cromatogramas obtenidos de muestras de exudados radicales de avenilla, colectadas continuamente desde la emergencia (E-1) y la cuarta hoja de desarrollo (E-4), con las del respectivo control sin plántulas de avenilla (C) a una longitud de 254 nm. A esta longitud de onda se detectaron siete puntos máximos. Al comparar los tiempos de retención de cada uno de estos puntos máximos con los estándares de ácidos fenólicos y cumarinas (Cuadro 1), se logró, tentativamente, identificar los compuestos: escopoletina, cumarina, ácido p-hidroxibenzoico y ácido vanilínico. Como el máximo espectro de absorción de la escopoletina está a los 342 nm, las mismas muestras fueron analizadas con el detector regulado a esta longitud de onda y luego el cromatograma obtenido se comparó con los respectivos controles (Figura 4-b). Analizando de esta forma las muestras, se observó un considerable aumento del área asignada a los tiempos de retención de la escopoletina.

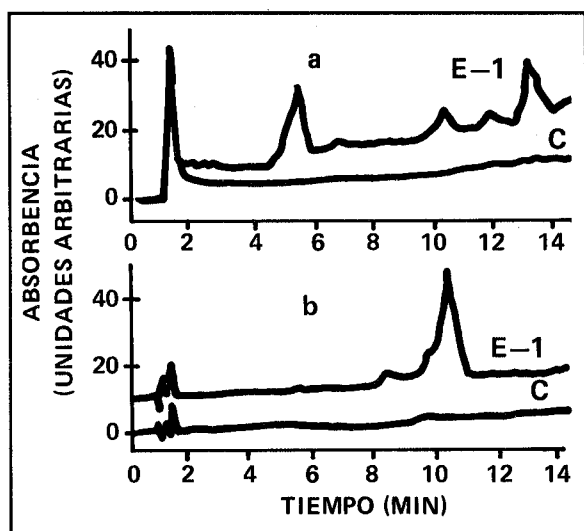


FIGURA 4. Cromatogramas realizados con HPLC de exudados radicales de avenilla recolectados entre la emergencia y la primera hoja (E-1) y de los controles (C). Longitud de onda del detector puesto a 254 nm (a) y 340 nm (b).

FIGURE 4. HPLC chromatograms of wild oat root exudates collected between emergence and first leaf stage (E-1) and of control pots (C). Wavelength of the detector was fixed at 254 nm (a) and 340 nm (b).

La escopoletina fue el mayor compuesto aleloquímico encontrado en los exudados de la maleza analizados. La cantidad de escopoletina liberada por las 30 plántulas entre la emergencia y la primera hoja de desarrollo, período aproximado de 7 días de recolección, fue de 6 μg , lo que equivaldría a la liberación de 20 ng de escopoletina por cada plántula durante este lapso.

DISCUSION

Recolección de exudados radicales. Se ha empleado varios métodos para recolectar aleloquímicos de raíces intactas de plantas. Estos métodos se han basado en la extracción con solventes orgánicos desde cultivos hidropónicos (Eberhardt, 1955; Borner, 1960, citados por Tang, 1986) y lavado de medios enraizantes inertes como la arena (Abdul-Wahab y Rice, 1967). Ambos métodos son tediosos y parecen ser limitados para la separación de aleloquímicos (Fay y Duke, 1977). El método de recolección continua de exudados de raíces desarrollado por Tang y Young (1982) solucionó estas dificultades metodológicas al usar la resina Amberlite XAD-4 que retiene solamente compuestos hidrofóbicos, los que pueden ser posteriormente disueltos con solventes orgánicos. Una seria limitación de este método es, sin embargo, la posibilidad de contaminación con microorganismos. Para solucionar esta dificultad los controles deben ser rigurosamente establecidos de manera de asegurar

inequívocamente que los compuestos adsorbidos por la resina son originados exclusivamente por las plántulas en estudio. En estos experimentos, los controles fueron sometidos a las mismas condiciones de las botellas plantadas con avenilla. Los bioensayos donde se usaron muestras colectadas de las columnas controles, no produjeron ningún tipo de efecto negativo sobre las plántulas de trigo y con la excepción de un caso aislado, el posterior análisis de estas muestras con HPLC indicaron la ausencia de contaminantes que pudiesen haber distorsionado los resultados. El uso de la vermiculita como medio inerte de crecimiento de las plántulas fue la mayor diferencia en relación al método originalmente descrito.

Identificación de los aleloquímicos de la avenilla.

Los siete puntos máximos fueron detectados con el HPLC regulado a 254 nm cuando se utilizó una columna RP C-18 y un gradiente ácido de H_2O y MeOH . Al usar el detector μv a 340 nm, sólo tres máximos fueron detectados y cuyos tiempos de retención coincidieron con aquellos máximos 3, 4 y 5 detectados a 254 nm, pero cuyas respectivas áreas en el cromatograma aumentaron, indicando, de este modo, que a esta longitud de onda el coeficiente de extinción es mayor. La comparación de los tiempos de retención de los puntos máximos desconocidos con los estándares de compuestos fenólicos y cumarina, permitió reconocer el ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanilínico, escopoletina y cumarina. Los puntos máximos 3 y 7, no pudieron ser identificados. El máximo 4 apareció solamente en los controles cuando el detector se fijó a 340 nm, el que fue, por lo tanto, atribuido a una contaminación orgánica. La escopoletina se ha encontrado en numerosas variedades de avena (*Avena sativa* L.) (Fay y Duke, 1977). La escopoletina y el ácido vanilínico fueron tentativamente identificados de exudados recolectados con solventes orgánicos a partir de plántulas de avenilla cultivada hidropónicamente (Schumacher, Thill y Lee, 1983).

Toxicidad de los exudados de avenilla. Exudados radicales de avenilla colectados entre la emergencia y la primera hoja inhibieron el desarrollo del coleoptilo y de la radícula de plántulas de trigo. Einhelling, Rice y Ricer (1970) han señalado que la escopoletina inhibe el crecimiento de las plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), maravilla (*Helianthus annuus* L.) y la quihuilla (*Chenopodium album* L.) en concentraciones de 0,1 mM. También se ha señalado que raíces de tabaco y maravilla absorbieron escopoletina de una solución nutritiva y que cantidades importantes de ellas fueron translocadas, posteriormente, hacia las hojas (Rice, 1984). La concentración de escopoletina presente en los exudados de avenilla analizados en el presente ensayo fue del orden de 0,1 μM . Aunque la sensibilidad del trigo a la escopoletina podría ser mayor

que aquella mostrada por el tabaco, la maravilla y la quihuilla, es probable que los volúmenes usados en los bioensayos, sean todavía muy bajos para producir los elevados niveles de fitotoxicidad que se indican en este estudio, para que éstos sean atribuibles solamente a la escopoletina. La presencia de otros aleloquímicos en los exudados radicales podría haber potenciado la acción fitotóxica de la escopoletina, tal como ha sido

indicado recientemente con otros aleloquímicos (Blum y otros, 1985; Blum y otros, 1989).

Los resultados presentados en esta investigación sugieren, grandemente, que la alelopatía podría estar involucrada en las severas reducciones de rendimiento que se asocian a altas infestaciones de avenilla en las sementeras de trigo, relación que ha sido demostrada como lineal por Cudney y otros (1989).

RESUMEN

Se recolectaron exudados radicales de raíces intactas de plántulas de avenilla (*Avena fatua* L.) usando una modificación del método propuesto por Tang y Young. Los exudados de la maleza inhibieron el crecimiento radical y del coleoptilo de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) primaveral, cv Millaleu-INIA. Usando el

HPLC se determinó la presencia de escopoletina, cumarina, ácido p-hidroxibenzoico y ácido vanilínico desde los exudados de raíces recolectados. La escopoletina fue el principal aleloquímico identificado.

Palabras claves: alelopatía, avenilla, escopoletina, exudados radicales.

LITERATURA CITADA

- ABDUL-WAHAB, A.S. and RICE, E.L. 1967. Plant inhibition by Johnson grass and its possible significance in old field succession. *Bull. Torrey Bot. Club* 4: 486-497.
- BELL, A.R. and NALEWAJA, J.D. 1968. Competition of wild oats in wheat and barley. *Weed Sci.* 16: 505-509.
- BLUM, U., DALTON, B.R. and SHANN, J.R. 1985. Effects of ferulic and p-coumaric acids in nutrient culture of cucumber leaf expansion as influenced by pH. *J. Chem. Ecol.* 11: 1.567-1.582.
- BLUM, U., GERIG, T.M. and WEED, S. 1989. Effect of mixtures of phenolic acids on leaf area expansion of cucumber seedlings grown in different pH Portsmouth as soil materials. *J. Chem. Ecol.* 15: 2.413-2.423.
- CARLSON, H.L. and HILL, J.E. 1985. Wild oat (*Avena fatua* L.) competition with spring wheat (*Triticum aestivum* L.): plant density effects. *Weed Sci.* 33: 176-181.
- CUDNEY, D.W., JORDAN, L.S., HOLT, J.S. and REINTS, J.S. 1989. Competitive interactions of wheat (*Triticum aestivum*) and wild oats (*Avena fatua*) grown at different densities. *Weed Sci.* 37: 538-543.
- EINHELLING, F.A., RICE, E.L. and RISSER, P.G. 1970. Effects of scopoletin on growth CO₂ exchange rates and concentration of scopoletin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull. Torrey Bot. Club* 97: 22-33.
- FAY, P.K. and DUKE, W.B. 1977. An assessment of allelopathic potential in *Avena* germplasm. *Weed Sci.* 25: 224-228.
- MARTIN, M.P., FIELD, L.D. and FIELD, R.J. 1987a. Competition between plants of wild oats (*Avena fatua* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Weed Res.* 27: 119-124.
- MARTIN, R.J., CULLIS, B.R. and Mc NAMARA, D.W. 1987b. Prediction of wheat loss due to competition by wild oats (*Avena fatua* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 38: 487-499.
- RICE, E.L. 1984. Allelopathy. 2nd ed., Academic Press, Orlando, Florida. p.: 65.
- SCHUMACHER, W.J., THILL, D.C. and LEE, G.A. 1983. Allelopathic potential of wild oats (*Avena fatua* L.) on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) growth. *J. Chem. Ecol.* 9: 1.235-1.245.
- SHARMA, M.P. and VAN DEN BORN, W.H. 1978. The biology of canadian weeds. 27. *Avena fatua* L. *Can. J. Plant Sci.* 58: 141.
- TANG, C.S. 1986. Continuous trapping techniques for the study of allelochemicals from higher plants. In: A.R. Putnam and C.S. Tang (ed.). *The Science of Allelopathy*. John Wiley and Sons. p.: 113-132.
- TANG, C.S. and YOUNG, C.C. 1982. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigalga Limpoggrass (*Hemarthria altissima*). *Plant Physiol.* 69: 155-160.
- TINNIN, R.O. and MULLER, C.H. 1972. The allelopathic influence of *Avena fatua*: The allelopathic mechanism. *Bull. Torrey Bot. Club* 99: 287-242.