

DIFERENCIAS AUXINICAS EN CULTIVOS AXENICOS Y NO AXENICOS

DE «SCENEDESMUS OBLIQUUS»

POR MARIA D. ITZIGSOHN¹

RESUMEN

1) Se ha estudiado la presencia de auxinas en *Scenedesmus obliquus* en algas obtenidas de cultivos unialgales no axénicos, determinándose un bajo contenido, con un Rf cercano al correspondiente a AIA.

2) Se han repetido los ensayos anteriores a partir de cultivos unialgales axénicos con resultados negativos. Las auxinas antes mencionadas se atribuyen a la acción de las bacterias contaminantes, ya sea porque las producen directamente, o bien a partir de un precursor originado en las algas.

3) Se ha estudiado la actividad de AIA oxidasa en *Scenedesmus obliquus* en algas vivas, en algas congeladas y a partir de la extracción del sistema enzimático, en todos los casos en condiciones axénicas. Los resultados obtenidos fueron negativos. Se considera que corroboran aquellos que indican la ausencia de auxinas en el alga estudiada.

SUMMARY

The presence of an auxin, with a Rf close to that of AIA, was determined in unialgal cultures of *Scenedesmus obliquus*. The auxin was absent when the algae were kept in axenic cultures.

The auxin content of the non-axenic cultures is attributed to the action of infecting bacteria, either directly produced by them or via a precursor formed by the algae.

It is considered that the negative results of the AIA oxidase activity, measured either on living or frozen algae as well as by extracting the enzymatic system, is a corroboration of the lack of auxin in the axenic cultures of *Scenedesmus obliquus*.

¹ Auxiliar de investigación Diplomada. División Biología Vegetal. Trabajo realizado bajo la dirección del Profesor Ing. Enrique M. Sívori.

En la literatura se citan datos contradictorios con relación al contenido en Acido Indol Acético (AIA) u otras sustancias de actividad auxínica en algas, fundamentalmente en organismos pluricelulares (A. Lang). Con referencia a formas unicelulares el único dato encontrado (J. Bentley, 1963) se refiere a la existencia de 2 ó 3 sustancias auxínicas interconvertibles, en *Chlorella pyrenoidosa*, *Oscillatoria* sp. y *Ochromonas malhamensis*.

En ensayos anteriores desarrollados en el laboratorio, no publicados (comunicación personal de la Lic. María R. Guitman), se encontró que el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* en medio completo con el agregado de AIA o bien de ácido giberellico, no guardaba relación con el menor crecimiento obtenido cuando ambos reguladores eran aplicados en forma simultánea. Se planteó entonces la posibilidad de la interferencia de un contenido natural de AIA en las algas y para verificarlo se realizó el presente trabajo.

AUXINAS

MÉTODOS

Cultivo

Scenedesmus obliquus proveniente de un cultivo unialgal (no axénico) creció en tubos de ensayo, en medio Arnon; al observarse una concentración suficiente las algas se transfirieron a un recipiente con 4,500 l. de igual solución nutritiva. La siembra fue aproximadamente de 500 algas por mm³.

La suspensión se agitó y al mismo tiempo se aeró por el burbujeo de aire filtrado por algodón estéril. La iluminación provista por 3 lámparas incandescentes de 100 W fue de 1500 bujías pie y se mantuvo durante las 24 horas del día.

Al observarse gran sedimentación se detuvo el cultivo y las algas fueron separadas por centrifugación y pesadas. Los datos se refieren a dicho peso fresco. El período entre siembra y detención del crecimiento para la extracción osciló entre 13 y 20 días. En cuanto al peso fresco obtenido en las diversas experiencias, varió entre 14,900 g y 25,150 g.

Extracción

El material se congeló a -30°C , luego fue descongelado y extraído con éter durante 1 h a 1°C en oscuridad, agitándose varias veces durante este lapso. A continuación se dejó decantar y se separó la capa etérea, repitiéndose una vez más la operación de extracción en las mismas condiciones; las algas fueron lavadas 2-3 veces y se reunió el

éter de todas las extracciones. El extracto se evaporó hasta 10-15 ml y se sometió a una bipartición fraccional ácida y alcalina. Para ello se agitó el extracto etéreo 3 veces con una solución de CO_3HNa 0,5 M (pH 8,6); esta fracción etérea con compuestos no ácidos no demostró actividad auxínica por eso se descartó en ensayos posteriores. La solución acuosa fue acidificada a pH 3,5 con HCl y se extrajo con éter otras 3 veces. Finalmente el éter fue concentrado y sometido a separación cromatográfica descendente sobre papel Whatman N° 1, utilizando como solvente isopropanol: amoníaco: agua (10:1:1). En el mismo papel se sembraron 15-20 μg de AIA. Los cromatogramas se examinaron con luz ultravioleta y posteriormente fueron cortados y utilizados para la prueba del crecimiento recto de coleoptiles de trigo (var. Bordenave Puan).

RESULTADOS

Los dos primeros ensayos indicaron la existencia de un compuesto de actividad auxínica, que corría con un Rf aproximado al del AIA utilizado como patrón (gráfico 1).

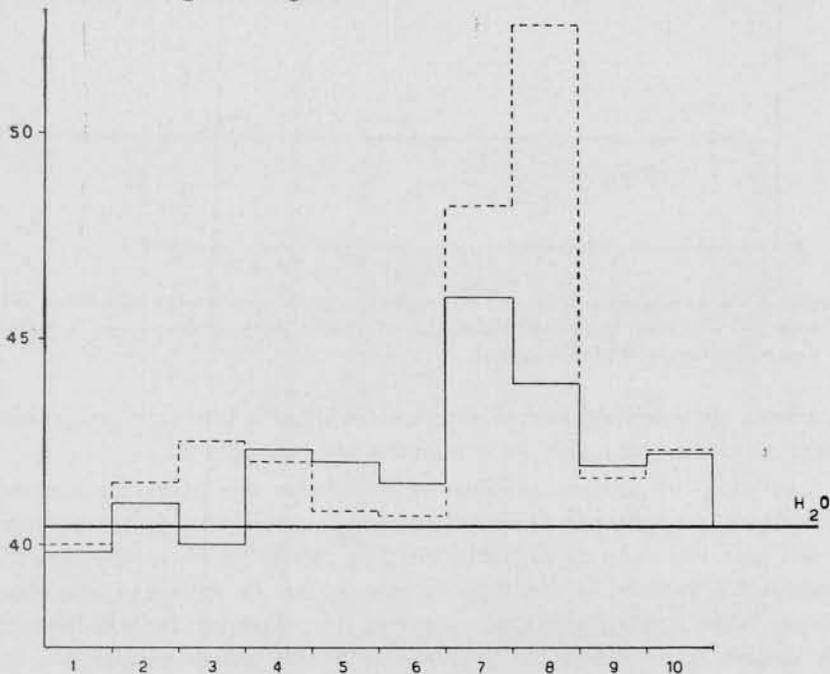


Gráfico 1. — Actividad auxínica en *Scenedesmus obliquus* proveniente de cultivos no axénicos; - - - - actividad correspondiente al AIA usado como testigo; — actividad correspondiente al extracto algal.

Si bien hasta este momento se trabajó con cultivos unialgales y en ningún caso se reveló una fuerte contaminación bacteriana, era evidente que no se trataba de un cultivo axénico. Existía en consecuencia la posibilidad de la intervención de otros microorganismos en la producción de las auxinas determinadas.

Esta circunstancia indicó la necesidad de repetir los ensayos con cultivos axénicos, que se obtuvieron por repiques consecutivos y ais-

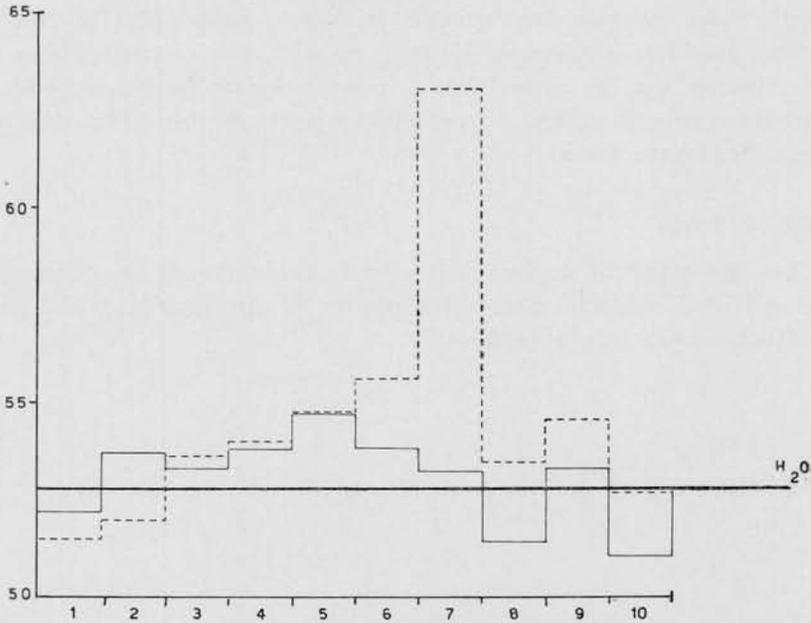


Gráfico 2 — Actividad auxínica en *Scenedesmus obliquus* proveniente de cultivos axénicos; ---- actividad correspondiente al AIA usado como testigo; — actividad correspondiente al extracto algal.

lamiento de colonias, intercalados con pruebas sobre agar peptonado para revelar la presencia de contaminación microbiana.

Logrados los cultivos axénicos se repitieron dos veces los ensayos anteriores, aumentando las precauciones de esterilidad de los equipos y del aire utilizado en el burbujeo. Los resultados se exponen en el gráfico 2 e indican la ausencia de compuestos de actividad auxínica. Estos datos revelan positivamente que las algas en las condiciones de cultivo mencionadas no poseen una auxina activa extractable. Se plantea entonces el interrogante del origen de los reguladores activos correspondientes a los dos primeros ensayos, que podrían interpre-

tarse como producidos directamente por la flora bacteriana contaminante o bien porque esta transforma precursores producidos por las algas, como podría ser el triptofano.

AIA OXIDASA

Como dato complementario se consideró de interés determinar la presencia o no de Acido Indol Acético-Oxidasa. En primer lugar se determinó si las algas podrían destruir directamente el AIA de la solución donde estaban suspendidas. Con este objeto se utilizó una suspensión de algas en solución Arnon de pH 6,6 determinándose la variación del contenido de AIA coloriméricamente con un espectrofotómetro Beckman DU según el método de Gordon y Weber, 1961. Se trabajó de la siguiente forma: la suspensión de algas con la solución de AIA se mantuvo en un baño a 30° C; cada hora se extrajo una muestra de 2 ml, se centrifugó y en 0,5 ml de la solución sobrenadante se agregaron los reactivos correspondientes ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$) y se realizaron las lecturas a los 25 minutos, valores que se compararon con una curva de AIA realizada previamente. Se introdujeron tres variantes, en la primera se trabajó con algas vivas; en la segunda con algas congeladas, en estas últimas se sustituyó la solución Arnon por una solución buffer pH 6,2. En la tercera las determinaciones se hicieron con algas congeladas agregándose diclorofenol 0,01 M y Cl_2Mn 0,01 M, conocidos estimulantes de la degradación enzimática del AIA. Los resultados se exponen en el cuadro I.

CUADRO I
Actividad de AIA Oxidasa en « *Scenedesmus obliquus* »

	1 h.	2 h.	3 h.
Algas sin congelar.....	1,25	10	11,25
Algas congeladas.....	1,6	3,34	3,34
Algas sin congelar + DCP +.....			
Cl_2Mn	1,38	4,5	4,5
Blanco.....	1,25	3,75	5

Destrucción de AIA después de 1,2 y 3 hs. en una suspensión de *Scenedesmus obliquus* en solución buffer de fosfatos de pH 6,2, expresado en porcentaje de la lectura inicial. El blanco está constituido por AIA más buffer.

Con el objeto de confirmar los resultados anteriores se realizó una nueva determinación utilizando en lugar de algas una extracción de AIA oxidasa (Mudd, et al., 1959). Los resultados se exponen en el cuadro II.

CUADRO II
Actividad de AIA Oxidasa por extracción en «*Scenedesmus obliquus*»

	1 h.	2h.	3 h.
Repetición 1.....	0	2,00	1,93
Repetición 2.....	1,93	4,74	4,81
Blanco.....	0	0	0,95

Destrucción de AIA a partir de la enzima extraída de *Scenedesmus obliquus* expresada en porcentaje de la lectura inicial.

Como puede deducirse de los resultados de los ensayos realizados, *Scenedesmus obliquus* no posee actividad de AIA oxidasa. Si bien se nota una ligera destrucción al transcurrir el tiempo igual comportamiento ocurre con el "blanco". Esta característica está en concordancia con los resultados negativos obtenidos en las determinaciones de la presencia de AIA, ya que si este compuesto existiese sería de esperar la presencia de AIA oxidasa como ocurre en la mayoría de las especies de plantas superiores estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- BENTLEY, J. A. *Some investigations on interconvertible naturally occurring auxins.* Plant Growth Regulation (Proc. 4th internat. Conf. on Plant Growth Regul. 1959), pp. 25-41, 1959.
- GORDON, S. A. and WEBER, R. P. *Colorimetric estimation of indoleacetic acid.* Plant Physiol. 26, pp. 192-195. 1951.
- LANG, A. *Physiology of growth and development in algae. A Synopsis.* Encyclopedia of Plant Physiology XV/1, pp. 688-689, 1965.
- LIBBERT, E., WICHNER, S., SCHIEWER, V., RISCH H. and KRAISER, W. *The influence of epiphytic bacteria on auxin metabolism.* Planta 68 (4), pp. 327-334, 1966.
- MUDD, J. D., et al. *Oxidation of indoleacetic acid by Queckgrass rhizomes.* Plant Physiol. 34, pp. 144-153, 1959.