

# ESTUDIO SOBRE LAS POSIBLES VÍAS DE INCORPORACIÓN DE SUSTANCIAS ALELOPÁTICAS AL SUELO

**Cristina Valares Masa, Juan C. Alías Gallego, Teresa Sosa Díaz y Natividad Chaves Lobón**

Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda. Elvas s/n. 06071-BADAJOS (España). Correo electrónico: cvalmas@unex.es

## Resumen:

En el suelo es donde las plantas terrestres desarrollan sus raíces, con las que absorben el agua y los nutrientes imprescindibles para su vida. Al mismo tiempo les sirve de anclaje para poder sostener toda su parte aérea. Por lo tanto, las propiedades del suelo que más van a influir en el desarrollo de las plantas terrestres serán las que determinen la disponibilidad de agua y de nutrientes, así como el crecimiento y expansión de las raíces. Pero a su vez las plantas con sus raíces, aporte de materia orgánica y síntesis de metabolitos van a modificar las propiedades del suelo. Por ello para entender las relaciones suelo-planta es también necesario estudiar cómo los compuestos derivados del metabolismo secundario de los vegetales pueden incorporarse al suelo y permanecer allí donde ejercen su acción. En este sentido, el objetivo de este trabajo es profundizar en las vías de incorporación de las sustancias alelopáticas identificadas en *Cistus ladanifer* cuyas funciones ecológicas, entre otras, son: la inhibición de la germinación y el desarrollo de herbáceas.

Palabras clave: *Cistus ladanifer*, Metabolismo secundario, Diterpenos, Flavonoides, Lixiviado, Hojarasca

## INTRODUCCIÓN

La definición más extendida de alelopatía es la dada por RICE en 1984: "Cualquier efecto, perjudicial o beneficioso, directo o indirecto, que una planta produce sobre otra (incluyendo los microorganismos) a través de la producción de compuestos químicos liberados al medio". Estos compuestos alelopáticos son liberados al medio mediante volatilización, descomposición de residuos o secreción en diferentes partes de la planta como hojas, tallos, raíces y flores (PUTNAM & TANG, 1986; WALLER, 1987; INDERJIT & DAKSHINI, 1995).

Con los primeros estudios sobre alelopatía se han aislado e identificado diferentes aloquímicos como furanocumarinas, cumarinas simples,

piranocumarinas, ácido cinámico y sus derivados, catecol, hidroxiacetofenonas, flavonoles y proantocianidinas (DATTA & CHATTERJEE, 1980; BALLESTER et al., 1982; KIL & YIM, 1983; NILSSON et al., 1993; PELLISIER, 1993; MACÍAS et al., 1993; LI et al., 1993; VILES & REESE, 1996). Y en particular, aunque el modo de acción de los compuestos fenólicos en el mecanismo de alelopatía no se conoce, sí se ha demostrado que los compuestos fenólicos pueden bajar la disponibilidad de ciertos nutrientes e influir en las características del suelo como pH y materia orgánica (RICE, 1984; APPEL, 1993; INDERJIT, 1996). La adición de compuestos fenólicos como los ácidos: protocateico, p-cumárico, hidroxibenzoico y felúrico, reducen el contenido de nitrógeno, fósforo y materia orgánica. Esto podría deberse a

diferentes procesos como absorción, alteración microbiana de compuestos fenólicos y mineralización microbiana (INDERJIT & MALLIK, 1997). Estas condiciones alteradas de los suelos pueden afectar negativamente el crecimiento de las plantas (BLACK, 1973).

Actualmente es necesario profundizar en el conocimiento de la alelopatía. No es suficiente que los diferentes órganos de una planta presenten compuestos con actividad alelopática, sino que éstos tienen que pasar al suelo y estar presentes en él. Por ello, el estudio de las vías de incorporación al suelo y la permanencia en este medio es de vital importancia.

La liberación de los compuestos con función alelopática por parte de las plantas donadoras dependerá, entre otros factores, de la naturaleza de estas moléculas. Pueden tener carácter volátil, hidrosoluble o poco soluble en agua. Otro aspecto importante en el proceso de llegada de los aleloquímicos al suelo son las vías de incorporación al medio para que sean susceptibles de afectar a otros organismos. Estas posibles vías pueden ser mediante volatilización, lavado por lluvia (lixiviado), exudación radicular y descomposición. Según referencias bibliográficas, la acumulación y degradación de los residuos vegetales en el suelo, así como el lixiviado por las lluvias parecen los mecanismos más importantes en regiones húmedas. En climas secos los mecanismos más frecuentes son la acumulación de residuos y la volatilización.

En estudios previos realizados sobre *Cistus ladanifer* se ha demostrado que en esta especie, las hojas y tallos fotosintéticos segregan un exudado muy abundante, sobre todo, durante la estación estival. Este exudado presenta actividad alelopática sobre especies como *Cynodon dactylon* y *Rumex crispus*, cuya germinación es claramente inhibida, y en especies como *Medicago polymorpha* y *Lolium rigidum*, que retrasa la germinación e inhibe el tamaño de raíces y cotiledones (CHAVES & ESCUDERO, 1997). También se ha determinado que este exudado es rico en diterpenos como ácido oxocatóxico, ácido 7-oxo-8-labden-15-oico y ácido 6 $\beta$ -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico, y ácidos fenólicos, siendo los compuestos mayoritarios los siguientes flavonoides: apigenina, 3-O-metil-kampferol, 4'-O-metilapigenina, 7-O-metilapigenina, 3,4'-di-O-metil-kampferol y 3,7-di-O-metil-

kampferol (CHAVES et al., 2001a, b; ALÍAS, 2006). Con ambos grupos se ha comprobado su presencia en los suelos asociados a esta especie confirmando su liberación por parte de la planta y acumulación en el sustrato (CHAVES et al., 2003). Nuevos estudios muestran que estos compuestos no son degradados inmediatamente, sino que permanecen en el suelo durante varios meses, siendo los flavonoides los que más perduran en el medio (datos no publicados). La permanencia de estos compuestos en el suelo durante tanto tiempo puede afectar tanto a las propiedades del suelo, como a microorganismos, semillas y plántulas presentes en él.

Sería interesante conocer como estos metabolitos liberados llegan al suelo. Por ello, el objetivo de este trabajo es profundizar en las vías de incorporación de las sustancias alelopáticas identificadas en *Cistus ladanifer* cuyas funciones ecológicas, entre otras, son: la inhibición de la germinación y el desarrollo de herbáceas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recogida de muestra:

Se seleccionó un jaral situado en el municipio de Albuquerque (Badajoz), donde se colocaron seis bandejas cubiertas con una malla para recoger el agua de lluvia. Para determinar la cantidad de compuestos que se incorporan al suelo mediante el lixiviado de la hoja y la hojarasca, tres de estas bandejas se instalaron bajo la cobertura de varios individuos, y las otras tres se situaron fuera de la influencia del jaral cubiertas con una doble malla de plástico que contenía hojarasca. La cantidad de hojarasca de estas bandejas fue la recogida en la época de caída de la hoja (mayo y junio) en las bandejas situadas en el jaral. Durante un año, cada vez que se produjeron precipitaciones se recogió el lixiviado acumulado en las bandejas. Además se recogió agua de lluvia (bandejas control). Se determina el volumen de las muestras recogidas y se filtran: Primeramente con papel de filtro whatman y después con un kitasato con un filtro de microfibras de vidrio.

### Tratamiento de muestras:

Para la extracción de los compuestos fenólicos de las muestras se utilizó el método "Oasis SPE method for endocrine disruptors". Para ello

las muestras se ajustaron con ácido acético a pH 3, las columnas (Oasis HLB 30µm) se activaron con 3ml de metil t-butil eter (MTBE), 3ml de solución al 5% de metanol/agua y la elución se realizó con 6ml de una solución de 10% de metanol/MTBE. Finalmente, el eluyente se evapora con N<sub>2</sub> y el extracto resultante se resuspende en 1ml de metanol.

#### Análisis de la muestra:

Las muestras se analizaron mediante HPLC, con una columna analítica de fase reversa Spherisorb 5µ C-18 4,6x250 mm y una fase móvil de agua/metanol/tetrahidrofurano (56:16:28) a una velocidad de 0,75 ml·min<sup>-1</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis por HPLC mostraron la presencia de tres diterpenos tanto en el lixiviado de las bandejas colocadas en el jaral (lixiviado de hojas) como las cubiertas con hojarasca (lixiviado de hojarasca). No se detectó ninguno de estos compuestos en las aguas de lluvia recogidas en las bandejas control. Los diterpenos detectados fueron identificados como ácido 6β-acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico (D1), ácido 7-oxo-8-labden-15-oico (D2) y ácido oxocátvico (D3).

Las cuantificación de estos diterpenos se muestran en la tabla 1, observándose que el lixi-

viado de hojas presenta mayores cantidades que el de hojarasca. La composición en las diferentes muestras de lixiviado estudiadas varía cualitativa y cuantitativamente a lo largo del año, observándose el mismo comportamiento para los tres diterpenos tanto en el lixiviado de hoja como en el de hojarasca. Si observamos tanto la cantidad total (suma de los tres diterpenos) como la de cada diterpeno por separado, las mayores cantidades se encuentran en septiembre. Durante los meses de otoño esa cantidad se va reduciendo hasta llegar a desaparecer en febrero en los dos tipos de lixiviado. Estas cantidades vuelven a aumentar en el mes de agosto en los dos tipos de lixiviado.

D1 es el compuesto mayoritario. Esta presente durante todo el año excepto en una de las muestras del lixiviado de hojas recogida en febrero y en el de hojarasca de febrero, abril y mayo. D3 es el compuesto minoritario, detectándose únicamente desde agosto hasta octubre en el lixiviado de hojarasca y desde junio a octubre en el de hoja. D2 se encuentra presente durante todo el año en el lixiviado de hoja menos en una de las muestras de febrero y abril y en hojarasca no se detecta su presencia en el lixiviado desde mayo hasta agosto.

El método de liberación de los compuestos alelopáticos al medio puede seguir varias rutas. Una de ellas es la lixiviación producida por las lluvias (INDEJIT & DAKSHINI, 1996), pero para

	Lixiviado de hojas (pg/ml)				Lixiviado de hojarasca (pg/ml)			
	D1	D2	D3	Suma	D1	D2	D3	Suma
Agosto	258,6	61,8	41,7	361,5	33,3	0	19,2	52,5
Septiembre	330,8	115,8	89,7	536,4	104,4	51,8	33,7	189,9
Septiembre	47,4	12,9	8,6	69	61	23,9	14,9	99,7
Octubre	40,5	12,5	10,5	63,5	16,2	6,3	2,7	25,3
Octubre	10,1	28,8	2,3	41,2	3	3,1	0	6,1
Febrero	35,1	5,9	0	41	1,7	1,8	0	3,5
Febrero	0	0	0	0	0	0	0	0
Abril	11	0	0	11	0	0	0	0
Abril	6,3	4,4	0	10,7	1,9	1,3	0	3,1
Mayo	31,2	7,9	0	39,1	2,3	0,7	0	2,9
Mayo	17,8	4,6	0	22,4	0	0	0	0
Junio	40,6	9,3	4,5	54,3	3,6	0	0	3,6

**Tabla 1.** Cantidad de diterpenos (en picogramos por mililitro de agua de lluvia) en lixiviado de hoja y hojarasca. D1: Ácido 6β-acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico. D2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico. D3: Ácido oxocátvico

ello es necesario que se produzcan precipitaciones regulares durante todo el año. Bioensayos de JADERLUND et al., 1996 y HUANG et al., 1999, sugieren que los compuestos que afectan negativamente a la germinación y desarrollo de plántulas son solubles en agua y que podrían pasar al suelo por las lluvias o los primeros estadios de descomposición de las hojas.

Anteriores estudios sobre *Cistus ladanifer* muestran que la concentración de flavonoides presentes en el exudado coincide con su mayor o menor presencia en el suelo (CHAVES et al., 2003; SOSA et al., 2005). Además, la alternancia de precipitaciones propia del área mediterránea observada durante un año de muestreo y la presencia de mayor contenido de compuestos fenólicos en los suelos asociados a jarales durante los meses de mayor precipitación, apoyaban la hipótesis de que las lluvias puede ser el factor principal de incorporación de compuestos al suelo (SOSA, 2003). Sin embargo, como muestra este trabajo estos compuestos no se detectan en los lixiviados estudiados. Podemos deducir por tanto que la vía de incorporación de estos compuestos no es a través del lixiviado sino que como muestran recientes estudios (datos no publicados) podría ser a través de la descomposición de la hojarasca.

Otro método es la liberación de agentes alelopáticos por volatilización. Este método está frecuentemente designado a plantas que producen terpenoides. Los géneros que comúnmente liberan compuestos volátiles incluyen *Artemisia*, *Salvia*, *Parthenium*, *Eucalyptus* y *Brassica*. La toxicidad de los compuestos volátiles es prolongada, debido a su adsorción a las partículas del suelo, lo cual les permite permanecer varios meses en él. En ecosistemas mediterráneos, la liberación de compuestos alelopáticos a través de volatilización es muy frecuente, debido al predominio de altas temperaturas, e influencia la distribución de las especies vegetales. Trabajos como los de GUENTHER et al., 1995; OWEN et al., 1997 y LLUSIÀ & PEÑUELAS, 2000, confirman estas observaciones. Aún así, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la incorporación de los diterpenos de *Cistus ladanifer* al suelo puede producirse también a través del lixiviado de las hojas y hojarasca.

Otros estudios muestran que las hojas de *C. ladanifer* secretan la misma cantidad de los tres

diterpenos detectados siendo la síntesis de estos compuestos mayor en invierno que en el resto de estaciones, mientras que las cantidades encontradas en el suelo y hojarasca son mayores en verano (ALÍAS, 2006). Este nuevo resultado muestra que las cantidades detectadas del ácido 6 $\beta$ -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico en el lixiviado son mayores que las de ácido oxocátívico y ácido 7-oxo-8-labden-15-oico, lo que puede ser debido a la diferente solubilidad de estos compuestos. Los resultados presentan una clara tendencia estacional, siendo mayores en otoño cuando se producen lluvias más numerosas y abundantes, las cuales arrastran gran cantidad de estos compuestos presentes en la hoja. En invierno aunque la síntesis de estos compuestos es mayor, en los lixiviados de octubre y febrero encontramos menores cantidades, debido quizás a que las precipitaciones son menos abundantes (no se registran lluvias desde noviembre hasta febrero), lo que provoca que el arrastre sea menor. A partir de abril las cantidades detectadas son pequeñas pero con tendencia a aumentar a medida que nos aproximamos al verano coincidiendo con mayores cantidades encontradas en el suelo. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la caída de la hoja se produce en mayo y junio formando la cubierta vegetal.

Así, diferentes compuestos del exudado pueden diferir en su mecanismo de incorporación, degradación e interacción en el suelo, como ha sido demostrado en otros estudios (TATSUMI et al., 1994; ALEXANDER, 1994; DAO, 1987; HUANG et al., 1999). De este trabajo podemos concluir que los compuestos alelopáticos de *C. ladanifer* pueden presentar varias vías de incorporación al suelo siendo para los diterpenos el lixiviado de la lluvia y para los flavonoides posiblemente la descomposición de la hojarasca en el suelo.

## CONCLUSIONES

- En este estudio se pone de manifiesto la presencia en el lixiviado de hoja y de hojarasca de *Cistus ladanifer* compuestos presentes en el exudado de esta especie. Estos compuestos se identificaron como ácido oxocátívico, ácido 7-oxo-8-labden-15-oico, ácido 6 $\beta$ -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico.

- Se ha observado que la composición en las diferentes muestras de lixiviado estudiadas varía cualitativa y cuantitativamente a lo largo del año.
- Los resultados de este trabajo muestran que los flavonoides no se detectan en los lixiviados estudiados, lo que sugiere que este mecanismo no es utilizado por los flavonoides a pesar de ser *a priori* más solubles que los diterpenos.
- Por último, podemos afirmar que el mecanismo de transporte de los diterpenos desde las hojas y hojarasca hasta el suelo, se produce por lixiviación de las lluvias.

### Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias al proyecto y beca 3PR05A084 concedidos por la consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Junta de Extremadura.

### BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, M.; 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego, USA. Academic Press.
- ALÍAS, J.C.; 2006. *Influencia de los factores climáticos en la síntesis y actividad de compuestos fitotóxicos secretados por Cistus ladanifer* L. PhD Thesis. Universidad de Extremadura. Badajoz.
- APPEL, H.M.; 1993. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* 19: 1521-1552.
- BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. & VIEITEZ, E.; 1982. Allelopathic potential of *Erica vagans*, *Calluna vulgaris*, *Daboecia cantabrica*. *J. Chem. Ecol.* 8: 851-857.
- BLACK, C.A.; 1973. *Soil-plant relationships*. Scientific Publishers. Jodhpur, India.
- CHAVES, N. & ESCUDERO, J.C.; 1997. Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Fun. Ecol.* 11: 432-440.
- CHAVES, N.; SOSA, T.; ALÍAS, J.C. & ESCUDERO, J.C.; 2001a. Identification and effects of the interaction of phytotoxic compounds from exudate of *Cistus ladanifer* leaves. *J. Chem. Ecol.* 27: 611-621.
- CHAVES, N.; SOSA, T.; ALÍAS, J.C. & ESCUDERO, J.C.; 2003. Germination inhibition of herbs in *Cistus ladanifer* L. soil: Possible involvement of allelochemicals. *Allelopathy J.* 11(1): 31-42.
- CHAVES, N., SOSA, T. & ESCUDERO, J.C.; 2001b. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *J. Chem. Ecol.* 27: 623-631.
- CHIAPUSIO, G.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M.; REIGOSA, M.J.; GONZÁLEZ, L. & PELLISSIER, F.; 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemicals effects on the germination process? *J. Chem. Ecol.* 23: 2445-2454.
- DAO, T.H.; 1987. Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. In: G.R. Waller (ed.), *Sorption and mineralization of plant phenolic acids in soil*: 358-370. American Chemical Society. Washington, D.C.
- DATTA, S.C. & CHATTERJEE, A.K.; 1980. Allelopathy in *Polygonum orientale*: inhibition of seed germination and seedling growth of mustard. *Comp. Physiol. Ecol.* 5(2): 54-59.
- GUENTHER, A.; HEWITT, C.N.; ERICSSON, D.; FALL, R. & GERON, C.; 1995. A global model of natural volatile organic compound emissions. *J. Geophys. Res.* 100: 8873-8892.
- HUANG P.M.; WANG, M.C. & WANG, M.K.; 1999. Principles Practices in Plant Ecology. In: Inderjit, K.M.N. Dakshini & F.L. Chester (eds.), *Catalytic transformation of phenolic compounds in the soils*: 287-306. *Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton. Florida.*
- INDERJIT; 1996. Plant Phenolics in Allelopathy. *Bot. Rev.* 62(2): 186-202.
- INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M.; 1995. Allelopathy: organisms, processes, and applications. In: Inderjit, K.M.N. Dakshini & F.A. Einhellig (eds.), *Quercetin and quercetrin from Pluchea lanceolata and their effect on growth of asparagus bean*: 86-95. American Chemical Society. Washington, DC.
- INDERJIT & DAKSHINI, K.M.M.; 1996. Allelopathic potential of *Pluchea lanceolata*:

- comparative study of cultivated fields. *Weed Sci.* 44: 393-396.
- INDERJIT & MALLIK, A.U.; 1997. Effect of phenolic compounds on selected soil properties. *Forest Ecol. Manage.* 92: 11-18.
- JADERLUND, A.; ZACKRISSON, O. & NILSSON, M.Ch.; 1996. Effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) litter on seed germination and early seedling growth of four boreal tree species. *J. Chem. Ecol.* 22(5): 973-986.
- KIL, B.S. & YIM, Y.J.; 1983. Allelopathic effects of *Pinus densiflora* on undergrowth of red pine forest. *J. Chem. Ecol.* 9(8): 1135-1151.
- LI, J.; INOUE, M.; NISHIMURA, H.; MIZUTANI, J. & TSUZUKI, E.; 1993. Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* 19(8): 1775-1787.
- LLUSIÀ, J. & PEÑUELAS, J.; 2000. Seasonal Patterns of terpene content and emisión from seven mediterranean woody species in field conditions. *Am. J. Bot.* 87(1): 133-140.
- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.; MASSANET, J.M.; RODRÍGUEZ-LUIS, F. & ZUBIA, E.; 1993. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *J. Chem. Ecol.* 19(7): 1371-1379.
- NILSSON, M.C.; HÖGBERG, P.; ZACKRISSON, O. & FENGYOU, W.; 1993. Allelopathic effects by *Empetrum hermaphroditum* on development and nitrogen uptake by roots and mycorrhizae of *Pinus silvestris*. *Can. J. Bot.* 71: 620-628.
- OWEN, S.; BOISSARD, C.; STREET, R.A.; DUCKHAM, C.; CSIKY, O. & HEWITT, N.; 1997. Screening of 18 Mediterranean plant species for volatile organic compound emissions. *Atmos. Environ.* 31: 101-117.
- PELLISSIER, F.; 1993. Allelopathic inhibition of spruce germination. *Acta Oecologica* 14(2): 211-218.
- PUTNAM, A.R. & TANG, C.S.; 1986. Allelopathy: State of the science. In: A.R. Putnam & C.S., Tang (eds.), *The science of allelopathy*: 1-19. John Wiley. New York.
- RICE, E.L.; 1984. *Allelopathic*. Academic Press. Orlando. Florida.
- SOSA, T.; 2003. *Contribución al estudio de las funciones ecológicas que pueden desempeñar los compuestos derivados del metabolismo secundario en Cistus ladanifer L.* PhD Thesis. Universidad de Extremadura. Badajoz.
- SOSA, T.; ALÍAS, J.C.; ESCUDERO, J.C. & CHAVES, N.; 2005. Interpopulational variation in flavonoid composition of *Cistus ladanifer L. exudate*. *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 353-364.
- TATSUMI, K.; FREYER, A.; MINARD, R.D. & BOLLAG, J.M.; 1994. Enzyme-mediated coupling of 3,4-dichloroaniline and ferulic acid. *Environ. Sci. Technol.* 28: 210-215.
- VILES, A.L. & REESE, R.N.; 1996. Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. *Environ. Exp. Bot.* 36(1): 39-43.
- WALLER, G.R.; 1987. *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*. ACS Symposium Series 330. American Chemical Society. Washington, DC.