

Efecto fitotóxico de *Medicago* sp. sobre malas hierbas problemáticas en viñedo

VALENCIA-GREDILLA F¹, PEDROL N², IGLESIAS-RODRÍGUEZ J², CANABAL-ABALO A², SOUTO C², RECASENS J¹, PUIG CG²

¹Grupo de Malherbología y Ecología Vegetal. Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Agrotecnio-ETSEA. Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

francisco.valencia@hbj.udl.cat, jrecasens@hbj.udl.cat

²Grupo de Agrobiología ambiental: calidad de suelos y plantas, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Pontevedra.

cgpuig@uvigo.es, pedrol@uvigo.es, joseiglesiasr@uvigo.es, ancanabal@gmail.com, csouto@uvigo.es

Resumen: Las distintas especies empleadas como cubiertas vegetales en cultivos de viña han mostrado ejercer cierto control sobre las malezas al competir con las mismas tanto por nutrientes y agua como por espacio. Además, cuando se siegan y se utilizan como acolchado pueden actuar como barrera física que limite la emergencia de malas hierbas, en particular de especies anuales. Pero, ¿y si, al mismo tiempo, parte de ese control se debiera a la liberación de sustancias alelopáticas capaces de inhibir la germinación y el desarrollo de ciertas malas hierbas? En este estudio *in vitro* se evaluó el potencial fitotóxico de los extractos acuosos de dos especies leguminosas empleadas como cubierta o acolchado vegetal en viña: *Medicago sativa* cv. ‘Victoria’ y *M. rugosa* cv. ‘Sapo’, probados a diferentes concentraciones (0,0, 33,3 y 66,7 g L⁻¹) sobre la germinación y crecimiento temprano de *Conyza bonariensis* y *Aster squamatus*. Los extractos acuosos mostraron efectos fitotóxicos dosis-dependientes, destacando el extracto de *M. sativa* al inhibir completamente la germinación de ambas especies. Mediante análisis químico de los extractos acuosos por HPLC-DAD, se obtuvieron e identificaron compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) potencialmente responsables de la fitotoxicidad observada.

Palabras clave: alelopatía, compuestos naturales, cubierta vegetal, acolchado vegetal, leguminosas.

1. Introducción

La gestión del suelo del viñedo mediante el manejo de una cubierta vegetal se ha convertido en una de las opciones preferidas por los viticultores. Dentro de las ventajas que conlleva este sistema de manejo (ambiental, agronómico y económico) (Ibáñez, 2015), resulta de especial interés la presión que puede ejercer sobre las malas hierbas. Una cubierta vegetal compite por nutrientes, agua y espacio, como acolchado ejerce

como de barrera física y en ambos casos puede inhibir la emergencia y desarrollo de malas hierbas a través de la liberación de sustancias alelopáticas. La alelopatía es una herramienta más que nos ayuda a manejar las malas hierbas en los cultivos, y su efecto depende tanto de la especie utilizada como cubierta y/o acolchado, como de las malas hierbas que se desean controlar. Estudios recientes avalan el potencial efecto alelopático de ciertas especies utilizadas como cubierta vegetal (e.g., Álvarez-Iglesias *et al.*, 2014, Hartwig & Ammon, 2002) y en concreto el de algunas leguminosas utilizadas a su vez como fijadoras de nitrógeno (Álvarez-Iglesias *et al.*, 2014, Pardo-Muras *et al.*, 2018). En este sentido, se ha planteado un estudio cuyos objetivos son, por un lado, evaluar el potencial fitotóxico de los extractos acuosos de dos especies leguminosas: *Medicago sativa* cv. ‘Victoria’ y *M. rugosa* cv. ‘Sapo’, probados a diferentes concentraciones (0, 33,34 y 66,67 g L⁻¹) sobre la germinación y el crecimiento temprano de *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. y *Aster squamatus* (Sprengel) Hieron. Por otro lado, mediante análisis químico de los extractos acuosos por cromatografía de líquidos de alta presión con detector diodo-array (HPLC-DAD), obtener e identificar los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) potencialmente responsables de la fitotoxicidad observada.

2. Material y Métodos

En noviembre de 2016, se sembraron las especies *M. sativa* cv. ‘Victoria’ y *M. rugosa* cv. ‘Sapo’ en el campus de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria en Lleida. En el momento de floración, se recolectó tanto la parte aérea como subterránea conjuntamente. Las muestras se dejaron secar en semioscuridad a una temperatura de 20°C hasta mantener un peso constante y posteriormente se almacenaron. En julio de 2017, en los laboratorios del grupo de Agrobiología ambiental de la Universidad de Vigo, y siguiendo la metodología descrita por Puig *et al.* (2013), el material vegetal se troceó en fragmentos de aprox. 1cm². De cada especie se añadieron en un matraz Erlenmeyer 66,7 g de material vegetal y 1 L de agua destilada. La mezcla se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 h, y se agitó manualmente cada seis horas para facilitar la homogeneización. A continuación, los extractos se pasaron por un filtro de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro para eliminar impurezas, y por un segundo filtro de 0,2 µm para conseguir prácticamente una asepsia total del extracto y evitar así una contaminación por microorganismos. Los extractos se diluyeron en agua destilada obteniendo tres dosis: 0,0, 33,3 y 66,7 g L⁻¹, correspondientes al control, dosis al 50% y dosis al 100%, respectivamente. Para el bioensayo se utilizaron semillas de *C. bonariensis* y *A. squamatus* recolectadas en septiembre de 2016 en una parcela de viña (*Vitis vinifera* L.) en la localidad de Raimat (Lleida). Momento previo al ensayo, las semillas se desinfectaron. Para evaluar el efecto fitotóxico de los extractos sobre la germinación de las semillas de ambas especies de malas hierbas, se utilizaron placas de seis pocillos de 3,48 cm de diámetro; en cada pocillo se colocaron 15 semillas sobre papel de filtro humedecido con 600 µL de cada disolución. Las placas se incubaron en cámaras de crecimiento a 30/20 °C para *C. bonariensis* y 15/5 °C para *A. squamatus*, con un fotoperiodo de 12 h para ambas especies. El número de semillas germinadas se

contó cada 24 h hasta que dejaron de observarse efectos de germinación en el control. Una semilla se consideraba germinada cuando la radícula superaba 1 mm (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963). Para la medición del crecimiento, se utilizaron diez semillas pre-germinadas de cada especie en placas Petri de 9 cm con 4 mL de extracto de cada concentración. Tras 48 h de incubación, se midió la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada plántula.

Ambos extractos acuosos se analizaron químicamente por HPLC-DAD con el fin de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides). Los bioensayos siguieron un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones por tratamiento. Los valores de germinación, así como del crecimiento de la radícula y del hipocótilo se expresaron como porcentajes relativos al control. Los valores obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Waller-Duncan de comparación múltiple de medias en caso de varianzas homogéneas. En el caso de datos que no cumplen los requisitos de las pruebas paramétricas, se aplicaron las pruebas de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc T2 de Tamhane. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 19.0 software package (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados y Discusión

Los extractos de ambas especies de *Medicago* mostraron un efecto significativamente inhibitorio ($P \leq 0,05$) sobre la germinación de *C. bonariensis* y de *A. squamatus*. Los extractos acuosos mostraron efectos fitotóxicos dosis-dependientes, destacando el extracto de *M. sativa* al inhibir completamente la germinación de ambas malas hierbas (Figura 1). En el caso de *M. rugosa*, una mayor concentración de extracto inhibió en mayor medida la germinación de ambas especies, reduciendo la germinación de *C. bonariensis* un 85% para la dosis más concentrada y un 48% para la dosis intermedia y en el caso de *A. squamatus*, un 95% y un 57%, respectivamente. Los extractos de ambas leguminosas resultaron ser fuertemente inhibidores del crecimiento radicular sobre ambas especies de malas hierbas, con un 100% para todas las dosis a excepción de *M. sativa* a dosis intermedia sobre *C. bonariensis*, cuya reducción fue del 96% pero sin diferencias significativas respecto al resto de tratamientos (Figura 1). El efecto de ambos extractos en el crecimiento del hipocótilo fue notablemente diferente entre ambas especies de malas hierbas. En *A. squamatus* se redujo el crecimiento en torno al 35% para el extracto de *M. rugosa* a ambas concentraciones y un 50% para *M. sativa* con la dosis de mayor concentración. En *C. bonariensis*, no se observaron diferencias significativas entre el efecto de los extractos y el control, estimulando incluso el crecimiento a excepción del extracto de *M. rugosa* a mayor concentración, que logró reducir el crecimiento de esta especie un 18% (Figura 1).

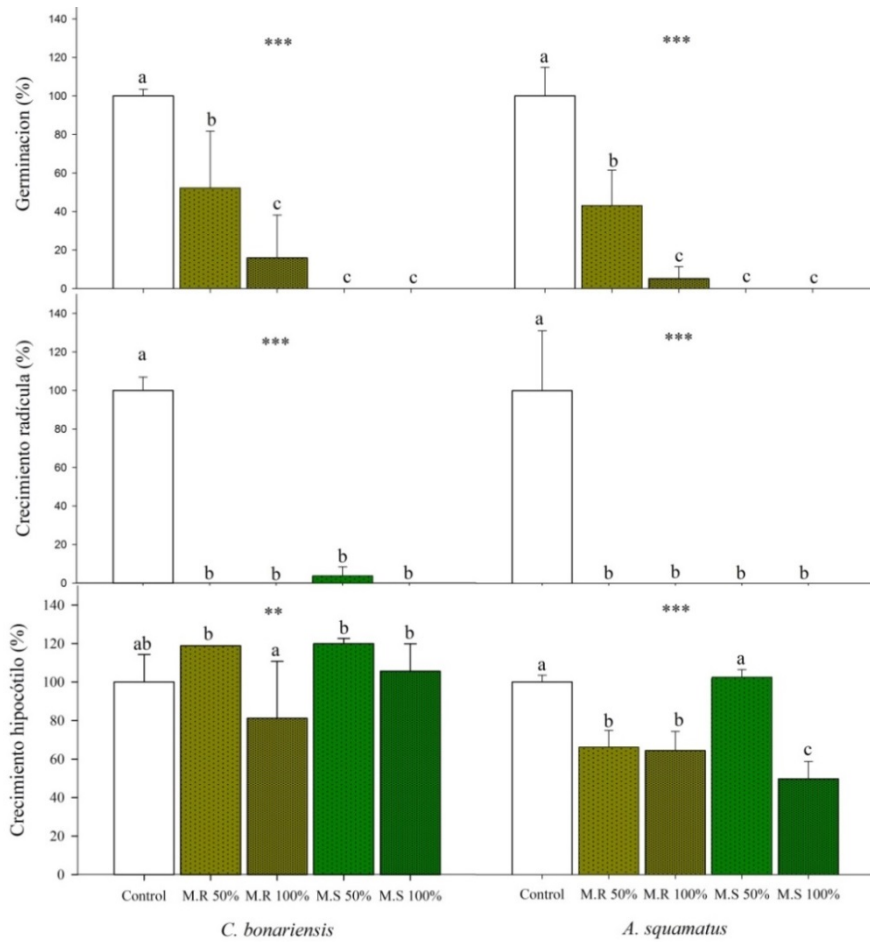


Figura 1. Efecto de los extractos acuosos de *Medicago rugosa* (M.R.) y *Medicago sativa* (M.S.) en la germinación de *Conyza bonariensis* y *Aster squamatus* a diferentes concentraciones (0%=0,0 g/L, 50%=33,3 g/L y 100%=66,7 g/L). Los valores medios están representados como porcentajes relativos del control. Las barras de error indican la desviación estándar. Para cada especie de mala hierba, los asteriscos denotan diferencias significativas entre los tratamientos: ** $P \leq 0,01$ y * $P \leq 0,001$ (ANOVA o Kruskal-Wallis H test). Para cada especie, letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (pruebas post-hoc Waller-Duncan o T2 de Tamhane).**

El efecto fitotóxico de *M. sativa* en la germinación y crecimiento radicular de malas hierbas ha sido constatado por otros autores: Koloren (2007) observó una inhibición de la germinación cercana al 100% en *Amaranthus retroflexus* (L.), *Lolium perenne* (L.), *Ipomoea hederacea* (Jacq.) o *Portulaca oleracea* (L.) a una dosis de extracto de 250 g L⁻¹. Otros autores han demostrado el efecto fitotóxico de la alfalfa sobre *Lolium rigidum* (Gaud.) (Zubair *et al.*, 2017). No obstante, y coincidiendo con nuestros resultados, los extractos de *M. sativa* pueden tener un efecto positivo en el inicio del crecimiento de las especies ensayadas, como demostraron Xuan *et al.* (2015), donde el extracto de tres cultivares de *M. sativa*, a las dosis más bajas ensayadas (50 y 100 ppm), incrementaron el crecimiento radicular y del hipocótilo en arroz y alfalfa.

Un total de doce compuestos fueron identificados en las especies de *Medicago* analizadas. El ácido ferúlico fue dominante en *M. sativa*, seguido del derivado de la luteolina '2' y la apigenina, representando el 29,6, 22,5 y 19,4%, respectivamente, de los compuestos identificados. En el caso de *M. rugosa*, el compuesto mayoritario fue el derivado de luteolina '2', seguido del elagitanino y un derivado de la apigenina, con presencia del 27,1, 19,8 y 15,0%, respectivamente. Varios compuestos han sido

identificados en distintos cultivares de *M. sativa*, como el ácido vainílico, ferúlico o ρ -hidroxibenzoico (Xuan *et al.* 2015) y la apigenina (Zubair *et al.*, 2017). Los extractos de otras leguminosas (e.g., *Canavalia ensiformis* L.) han demostrado tener un efecto fitotóxico, y en ellos, se han identificado algunos de los compuestos presentes en nuestros extractos, como el ácido ferúlico y el kaempferol (Pereira *et al.*, 2018). La fitotoxicidad de algunos de los compuestos identificados, como el ácido ferúlico, ρ -cumárico, ρ -hidroxibenzoico, así como el ácido vainílico, ya ha sido demostrada al inhibir o retrasar tanto la germinación como el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Reigosa y Pazos-Malvido, 2007). El control de malas hierbas que ejercen estas especies de leguminosas en campo podría deberse, entre otros factores, al potencial efecto alelopático causado por la liberación de estos ácidos fenólicos y flavonoides, a través del fenómeno alelopático. Estos resultados apoyan el uso de la alelopatía como una herramienta más en la gestión integrada de malas hierbas, reforzando así el uso de especies de leguminosas como cubierta o acolchado.

Tabla 1. Compuestos fenólicos de los extractos acuosos de las especies *M. sativa* y *M. rugosa* obtenidos a través de HPLC-DAD.

Compuesto	TR ^a	<i>Medicago sativa</i>		<i>Medicago rugosa</i>	
		Contenido ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de extracto acuoso)	% ^b	Contenido ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de extracto acuoso)	%
<i>Ácidos fenólicos</i>					
Ácido vainílico	19.2	2.81	1.7	4.57	2.1
Ácido ρ -hidroxibenzoico	22.3	2.96	1.8	0.00	0.0
Ácido ρ -cumárico	33	13.58	8.1	10.64	5.0
Ácido ferúlico	37.5	49.57	29.6	19.53	9.1
<i>Flavonoides</i>					
Elagitanino	20.3	0.00	0.0	42.48	19.8
Derivado de luteolina `1`	22.1	0.00	0.0	16.59	7.7
Ácido elágico	23	0.00	0.0	30.64	14.3
Luteolina	28.6	23.88	14.3	0.00	0.0
Derivado de Apigenina	31.3	0.00	0.0	32.18	15.0
Derivado de luteolina `2`	32	37.68	22.5	58.12	27.1
Kaempferol	32.5	4.34	2.6	0.00	0.0
Apigenina	33.2	32.41	19.4	0.00	0.0
TOTAL		167.24		214.76	

^aTR = tiempo de retención en min

^b% = porcentaje de cada compuesto respecto al total

4. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro del Proyecto Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2014-52465-C4-2-R financiado por el Ministerio de Industria y Competitividad. El primer autor ha contado con una beca predoctoral otorgada por la Universitat de Lleida.

Referencias

ÁLVAREZ-IGLESIAS L, PUIG CG, GARABATOS A, REIGOSA R M, PEDROL N (2014) *Vicia faba* aqueous extracts and plant material can suppress weeds and enhance crops. *Allelopathy Journal* **34**, 299-314

- HARTWIG N & AMMON H (2002) Cover crops and living mulches. *Weed Science* **50**, 688-699
- IBÁÑEZ S (2015) *Mantenimiento del suelo en el viñedo mediante cubiertas vegetales*. Ed. Gobierno de la Rioja. 167 p.
- KOLOREN O (2007) Allelopathic Effects of *Medicago sativa* L. and *Vicia cracca* L. Leaf and Root Extracts on Weeds. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **10**, 1639-1642
- MAYER AM, POLJAKOFF-MAYBER A (1963). *The Germination of Seeds*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press. pp. 244
- PARDO-MURAS M, PUIG CG, LÓPEZ-NOGUEIRA A, CAVALEIRO C, PEDROL N (2018) On the bioherbicide potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*: Profiles of volatile organic compounds and their phytotoxic effects. *Plos One* **13**, 1-21.
- PEREIRA JC, PAULINO CLA, GRANJA BS, SANTANA AEG, ENDRES L, DE SOUZA RC (2018). Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. *Revista Ceres* **65**, 243-252.
- PUIG CG., ALVAREZ-IGLESIAS L., REIGOSA MJ., PEDROL N (2013) *Eucalyptus globulus* leaves incorporated as green manure for weed control in maize. *Weed Science* **61**, 154-161.
- REIGOSA MJ, PAZOS-MALVIDO E (2007) Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* **33**, 1456-1466.
- ZUBAIR HM, PRATLEY J, SANDRAL G, HUMPHRIES A (2017) Allelopathic interference of alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes to annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Journal of Plant Research* **130**, 1-12.
- XUAN T D, TSUZUKI E, TERAO H, MATSUO M, KHANH TD (2003) Correlation between Growth Inhibitory Exhibition and Suspected Allelochemicals (Phenolic Compounds) in the Extract of Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Production Science*, **6**, 165-171.

Phytotoxic effect of *Medicago* sp. on problematic weeds in vineyard

Summary: Different species used as cover-crops in vineyard have shown to exert some control over weeds by competition (cover-crop) or as a physical barrier (mulching). But, can such control be partly due to the release of allelopathic substances, capable of inhibiting the germination and early growth of certain weeds? In this *in vitro* approach, the phytotoxic potential of two legume species used as cover-crops or vegetable mulch in vineyard was evaluated. Aqueous extracts of *Medicago sativa* cv. Victoria and *Medicago rugosa* cv. Sapo were tested at different concentrations (0.0, 33.3 and 66.7 g L⁻¹) on the germination and early growth of *Conyza bonariensis* and *Aster squamatus*. The aqueous extracts showed dose-dependent phytotoxic effects, and the effect of *M. sativa* extract inhibiting completely the germination of both target species is highlighted. The chemical analysis of the aqueous extracts was performed by HPLC-DAD, identifying some phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) potentially responsible for the observed phytotoxicity.

Keywords: allelopathy, natural compounds, cover-crop, mulching, legumes