

ESTUDIO DE LA PERSISTENCIA DE SUSTANCIAS ALELOPÁTICAS EN SUELOS DE ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS

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

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

Resumen

Los ecosistemas mediterráneos se caracterizan por presentar condiciones ambientales bastantes limitantes y en especial las comunidades de *Cistus ladanifer* L. Se ha demostrado que la presencia de esta especie provoca disminución de la riqueza y diversidad de herbáceas, pudiéndose atribuir este comportamiento a la capacidad alelopática de los compuestos fitotóxicos presentes en su exudado. Con todo ello, se ha planteado conocer si estos compuestos del exudado pasan al medio donde tienen que ejercer su acción, el suelo, y cual es su persistencia en el mismo. Este último aspecto es crucial para determinar la actividad alelopática de una especie.

Palabras clave: Aleopatía, *Cistus ladanifer* L., Ácidos fenólicos, Diterpenos

INTRODUCCIÓN

La Sociedad Internacional de Aleopatía (IAS) en 1996 definió la Aleopatía como “el proceso que involucra a metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos, excluyendo animales, incluyendo efectos positivos y negativos”, siendo una de las principales y poco entendidas causas de los problemas de regeneración de bosques. Generalmente se origina por la acumulación de sustancias con actividad fitotóxica en los suelos, los cuales activa o pasivamente modulan las condiciones imperantes en el suelo induciendo una restricción de las poblaciones vegetales y/o microorganismos (INDERJIT, 2005). Es de destacar que la aleopatía no disminuye la importancia de la competencia o de cualquier proceso ecológico y en la mayoría de los casos actúa como pro-

ceso sinérgico con otra interacción ecológica como la competencia (REIGOSA et al., 1999; IDERJIT & WEINER, 2001; MALLIK, 2002).

Los ecosistemas mediterráneos se caracterizan por tener condiciones ambientales bastantes limitantes y en especial las comunidades de *Cistus ladanifer* (NÚÑEZ, 1989). Esta especie interviene en la disminución de la riqueza y diversidad de herbáceas que se encuentra en las comunidades donde ella aparece y se han realizado experiencias que demuestran la presencia de compuestos con actividad alelopática en el exudado de esta especie (CHAVES et al., 1997a, 1997b, 1998, 1999, 2001a); y en el suelo asociado a ella (CHAVES et al., 2001b, 2003). Cuando se realizan trabajos en aleopatías, el primer paso es la identificación de los compuestos responsables de dicho efecto, pero hay que desvelar aspectos tan importantes como: la influencia de los aleloquímicos en la dinámica

de los nutrientes, el modo de transporte desde la planta donadora a la receptora y la biodisponibilidad (tiempo de permanencia y degradación) de estos compuestos en el medio natural (MACÍAS et al., 2003).

Considerando los estudios realizados sobre alelopatía en *C. ladanifer*, el objetivo principal que se ha planteado en este trabajo es conocer si los compuestos fitotóxicos presentes en el exudado pasan al medio donde tienen que ejercer su acción, el suelo, y cuál es su persistencia en el mismo. Este último aspecto es crucial para determinar la actividad alelopática de una especie, pues si estos compuestos son rápidamente degradados, o transformados en el suelo, pierden su capacidad fitotóxica (MACÍAS et al., 2005). Por el contrario, la persistencia de estos compuestos puede alterar el sustrato modificando la actividad microbiana, procesos de nitrificación, fijación de nutrientes, etc. (WHITE, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar seleccionado y recogida del suelo

El lugar seleccionado para la recogida del material fue un jaral situado en el término municipal de Alburquerque (39° 08' 05.1" N – 7° 00' 40.54" O). El suelo a estudiar fue recogido a finales de verano, en el mes de Septiembre. Tras retirar el dosel de hojarasca que cubre el suelo del jaral, se procedió a la toma de muestras de suelo procedentes de debajo de distintas jaras, no superando los 5 cm de profundidad.

Tratamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron mezcladas obteniendo un suelo homogéneo y representativo del jaral seleccionado. Posteriormente, el suelo fue colocado en bandejas de PVC y mantenido a la intemperie durante 10 meses. Durante este tiempo y una vez al mes se tomaron muestras de suelo de las bandejas para su posterior tratamiento y cuantificar así los compuestos potencialmente alelopáticos.

Para la extracción de los compuestos presentes en el suelo se procedió de la siguiente manera: 25 g de suelo se extraen con 40 ml de metanol, agitándose durante 2 horas. El extracto resultante se filtra y se evapora hasta un volu-

men final de 1 ml (5 réplicas al mes), almacenándose a 4°C para su posterior análisis.

Análisis de las muestras

Los extractos de suelo fueron analizadas por HPLC (Waters; Bombas: 515 HPLC Pump. Inyector: 717plus Autosampler. Detector: 996 Photodiode Array Detector). 25 μ l de extracto eran inyectados en una columna analítica de fase reversa Spherisorb 5 μ C-18 4,6x250mm. La fase móvil utilizada se correspondió con el método isocrático agua/metanol/tetrahidrofurano en las proporciones 56/18/26. Los compuestos cuantificados fueron los flavonoides (fenoles) y diterpenos (terpenos) mayoritarios en el exudado (CHAVES et al., 1998; ALÍAS, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos liberados por las plantas superiores pueden ser alterados por microorganismos en el suelo antes de que ejerzan su acción sobre la planta receptora (EINHELLING, 1995). A su vez, otros autores sugiere que es difícil establecer la fuente de producción de un compuesto aislado del medio edáfico (INDERJIT, 1997), pudiendo ser elementos directamente producidos por las plantas o productos de degradación. Ante estas perspectivas, si analizamos los resultados obtenidos en este estudio al medir la cantidad de compuestos presentes en el suelo con el paso del tiempo (Tabla 1) procedentes de *C. ladanifer* L., nos damos cuenta que ciertamente las cantidades de estos compuestos se ve modificada. A pesar de ello, en todos los meses el compuesto mayoritario es el 3,7-di-*O*-metil-kampferol. Además, el comportamiento de todos los compuestos en general es muy parecido. Es en el mes de diciembre (4 meses después del inicio de la cuantificación) cuando encontramos mayor cantidad de estos compuestos a excepción de los diterpenos cuya presencia no se detecta en el suelo en ningún momento.

Por otra parte, en la figura 1 podemos apreciar la cantidad de fenoles y terpenos totales, observando un aumento desde la muestra original tomada en Septiembre (5,37 mg·g⁻¹ de suelo) hasta Diciembre (22,46 mg·g⁻¹ de suelo), produciéndose a partir de este mes una disminución significativa

	Ap	K3	Ap4	Ap7	K3,7	D1	D2	D3
Septiembre	0,13	0,15	0,22	1,23	3,86	0,00	0,00	0,00
Octu.	0,15	0,22	0,46	1,38	6,93	0,00	0,00	0,00
Noviem.	0,15	0,23	0,99	1,59	8,17	0,00	0,00	0,00
Diciem.	0,14	1,30	3,41	3,97	13,65	0,00	0,00	0,00
Enero	0,07	0,22	1,96	2,44	7,23	0,00	0,00	0,00
Febrero	0,06	0,24	2,49	1,64	4,59	0,00	0,00	0,00
Marzo	0,05	0,20	0,50	1,17	4,81	0,00	0,00	0,00
Abril	0,14	0,17	0,48	1,31	3,09	0,00	0,00	0,00
Mayo	0,04	0,13	1,06	1,29	2,68	0,00	0,00	0,00
Junio	0,05	0,10	1,07	1,30	2,38	0,00	0,00	0,00
Julio	0,00	0,11	0,43	1,11	2,35	0,00	0,00	0,00

Tabla 1: Cantidad de flavonoides y diterpenos (expresado en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo) presentes en suelos asociados a *C. ladanifer*. Una vez recogidas las muestras en septiembre y ser depositadas fuera de la influencia de las jaras, éstas fueron analizadas a lo largo de 10 meses. **Ap:** apigenina; **K3:** 3-O-metilcampferol; **Ap4:** 4-O-metilapigenina; **Ap7:** 7-O-metilapigenina; **K3,7:** 3,7-di-O-metilcampferol; **D1:** Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; **D2:** Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; **D3:** Ácido 6-oxocativico

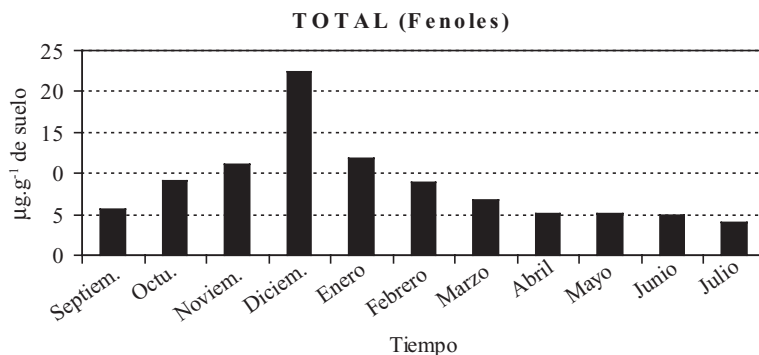


Figura 1: Cantidad total de flavonoides y diterpenos (expresado en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo) persistentes en suelos asociados a *Cistus ladanifer*

y progresiva. A pesar de esta disminución, cabe destacar la fuerte persistencia temporal que encontramos de estos compuestos fenólicos en el suelo a lo largo del año sin que exista un aporte continuo. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores para otras moléculas como son las benzoxazolinonas (GALIARDO et al., 1992; OLIVEROS, 2006; WILLIANSON et al., 2005). En este caso, el tiempo medio de degradación de los compuestos secretados por la planta no pasa de 4 días, con una conversión del 80%.

Por su parte, la ausencia de terpenos en estos suelos recogidos en Septiembre nos sugiere que las vías de incorporación y degradación son distintas a las de los fenoles. En este sentido, estudios sugie-

ren 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 (JADERLUND et al., 1996; HUANG et al., 1999). En estudios anteriores se han descrito y cuantificado la presencia y concentración de los terpenos y fenoles (flavonoides) en el exudado de *C. ladanifer*. En ellos se describe un aumento de los fenoles en las estaciones más calurosas, primavera y especialmente el verano (CHAVES et al., 2001b). Los terpenos, por su parte son mayoritarios en las estaciones más frías de otoño e invierno (ALÍAS, 2006). Estos resultados podrían explicar la ausencia de diterpenos en los suelos recogidos en

septiembre ya que aún no se habría producido en la planta la síntesis mayoritaria de estos compuestos ni tampoco su incorporación al suelo.

Por otro lado, el aumento inicial de fenoles en nuestro estudio puede ser debido a la descomposición de los restos de materia orgánica procedente de la hojarasca de la jara presente en el suelo y de su progresiva incorporación durante 4 meses (hasta diciembre). Este hecho reafirma la idea defendida por este equipo de investigación en estudios anteriores donde se constata que la vía de incorporación principal de los compuestos fenólicos presentes en el exudado de jara es a través de la caída de la hoja (SOSA, 2003; SOSA et al., 2005). Tras 4 meses, la cantidad de fenoles encontrados va disminuyendo hasta estabilizarse en el orden de $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo.

Aunque las cantidades de los mismos son bajas, del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo, su persistencia es alta, y su efecto directo inhibiendo la germinación y crecimiento de otras especies o indirectamente alterando las características del suelo, está garantizado. Ensayos de actividad realizados con compuestos derivados del exudado de esta planta presentan de igual modo, a bajas concentraciones, actividad fitotóxica significativa (ALÍAS, 2006; CHAVES et al., 2001a,b; SOSA et al., 2005).

CONCLUSIONES

Los resultados han puestos de manifiesto que los terpenos no aparecen en el suelo pudiendo deberse a la baja concentración de estos compuestos en el exudado de la planta en el mes de recogida de las muestras y por el tipo de vía de incorporación de estos compuestos al suelo. Por el contrario la permanencia de los fenoles es bastante alta, de hecho no desaparecen de este medio al menos en 10 meses. Aunque la cantidad es baja, su efecto negativo directo o indirecto sobre otras especies y el suelo está garantizado, pudiendo ser responsable de la dificultad en la regeneración del bosques donde ella está presente.

Agradecimientos

Agradecer a la consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico e Innovación la conce-

sión del proyecto 3PR05A084 en el marco del programa del III Plan Regional de Investigación, Desarrollo e Innovación en Extremadura. Del mismo modo agradecer a la misma consejería la concesión de la beca de investigación 3PR05A084, gracias a la cual se ha realizado y obtenido parte de estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- CHAVES, N. & ESCUDERO, J.C.; 1997a. Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Fun. Ecol.* 11: 432-440.
- CHAVES, N.; ESCUDERO, J.C. & GUTIÉRREZ-MERINO, C.; 1997b. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J. Chem. Ecol.* 23(3): 579-603.
- CHAVES, N.; RÍOS, J.L.; GUTIÉRREZ, C.; ESCUDERO, J.C. & OLÍAS, J.M.; 1998. Analysis of secreted flavonoids of *Cistus ladanifer L.* by high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chrom. A.* 799: 111-115.
- CHAVES, N. & ESCUDERO, J.C.; 1999. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: K.M.N. Inderjit, M. Dakshini & F.L. Chester (eds.), *Principles and Practices in Plant Ecology*: 267-285. Allelochemicals Interactions. CRC Press. Boca Raton.
- 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. & ESCUDERO, J.C.; 2001b. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *J. Chem. Ecol.* 27: 623-631.
- 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.

- EINHELLIG, F.A.; 1995. Allelopathy: current status and future goals. In: K.M.N. Inderjit, M. Dakshini & F.A. Einhellig (eds.), *Allelopathy: Organisms processes and application*: 1-24. American Chemical Society, Washington.
- GALIARDO, R. & CHILTON, W.; 1992. Soil transformation of 2(3H)-Benxoxalazolone of rye into phytotoxic 2-amino-3H-phenoxazin-3-one. *J. Chem. Ecol.* 18: 1683-1691.
- HUANG, P.M.; WANG, M.C. & WANG, M.K.; 1999. Principles Practices in Plant Ecology. In: K.M.N. Inderjit, M. Dakshini & F.L. Chester (eds.), *Catalytic transformation of phenolic compounds in the soils*: 287-306. Allelochemicals Interactions. CRC Press. Boca Raton.
- INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY; 1996. *First World Congress on Allelopathy: A science for the future*. Cádiz, España.
- INDERJIT, K.M.N. & MALLIK, A.U.; 1997. Effect of phenolic compounds on selected soil properties. *Forest Ecol. Manage.* 92: 11-18.
- INDERJIT, K.M.N. & WEINER, J.; 2001. Plant allelochemicals interference or soil chemical ecology? *Perspectives in Plant Ecology* 4: 3-12.
- INDERJIT, K.M.N.; 2005. Soil Microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. *Plant Soil* 274: 227-236.
- JADERLUND, A.; ZACKRISSON, O. & NILSSON, M.C.; 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.
- MACÍAS, F.A.; CASTELLANO, D. & MOLINILLO, J.M.G.; 2003. Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2513-2521.
- MACÍAS, F.A.; MARÍN, D.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; CASTELLANO, D.; SIMONET, A.M. Y MOLINILLO, J.M.G.; 2005. Structure-Activity relationship (SAR) studies of benzoxacinones, their degradation products and analoges. Phytotoxicity on standard target species (STS). *J. Agric. Food Chem.* 53: 538-548.
- MALLIK, A.U.; 2002. On the question of paradigm in the science of Allelopathy. In: *Allelopathy: from Molecules to Ecosystems*: 289-297. Science Publishers.
- NÚÑEZ, E.; 1989. *Ecología del jaral de Cistus ladanifer L.* PhD Thesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- OLIVEROS, A.; 2006. *Estudios alelopáticos en las gramíneas. Benzoxacinoides como aleloquímicos.* PhD Thesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz. Puerto Real.
- REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. & GONZÁLEZ, L.; 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 577-608.
- 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.
- WHITE, C.S.; 1994. Monoterpenes: their effect on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* 20: 1381-1406.
- WILLIANSO, W.; WARDLE, D. & YEATES, G.; 2005. Changes in soil microbial and nematode communities during ecosystem decline across a long-term chronosequences. *Soil Bio. Biochem.* 37: 1289-1301.