

POTENCIAL ALELOPÁTICO DE LA ALFALFA (*Medicago sativa* L.) SOBRE DIFERENTES LEGUMINOSAS FORRAJERAS

THE ALLELOPATHIC EFFECTS OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.) ON DIFFERENT FORAGE LEGUMES

C. CHOCARRO Y J. LLOVERAS

Agrotecnio. Universidad de Lleida. Rovira Roure 191. 25198. Lleida (España). chocarro@pvcf.udl.es

RESUMEN

En este estudio analizamos el efecto alelopático del extracto acuoso de la alfalfa (*Medicago sativa*) sobre ocho especies forrajeras: *Medicago sativa*, *Onobrychis viciifolia*, *Trifolium repens*, *T. pratense*, *T. incarnatum*, *Vicia sativa*, *V. villosa* y *Lotus corniculatus*. Se han utilizado cuatro concentraciones (0-10-20-40 g/l) de extracto acuoso de diferentes partes de la planta: raíz, tallo y hojas, analizado sus efectos sobre la germinación y la longitud radicular. Se observó una mayor fitotoxicidad sobre el crecimiento radicular que sobre la germinación de las especies. De las tres fracciones estudiadas, el extracto de hoja es el que más inhibe tanto la germinación como el crecimiento radicular. Las especies cuya germinación es más sensible a los extractos de raíz y tallos de alfalfa son *T. incarnatum* y *T. repens* mientras que con extractos de hojas también hay que añadir a *O. viciifolia*. Por otro lado, todas las especies (excepto *M. sativa*) mostraron una reducción del crecimiento radicular que sobrepasó el 80% cuando se trataron con extractos de hojas a concentraciones elevadas. Por tanto, en condiciones de laboratorio, la alfalfa mostró una clara fitotoxicidad, variable en intensidad según las especies, que de confirmarse en campo, habrá que tener en cuenta al instalar el cultivo siguiente.

Palabras clave: fitotoxicidad, germinación, longitud radicular.

SUMMARY

In this paper we analyze the allelopathic effect of three aqueous extracts: root, stem and leaves of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on different legumes. We used 4 different concentrations (0-10-20-40 g/l) of aqueous extract, quantifying the percentage of germination and root length of 8 legumes: *Medicago sativa*, *Onobrychis viciifolia*, *Trifolium repens*, *T. pratense*, *T. incarnatum*, *Vicia sativa*, *V. villosa* y *Lotus corniculatus*. Root elongation of selected seed was more affected than germination. Simultaneously, leaf extract showed higher inhibition of both processes than stem or root extracts. Concerning germination, the most sensitive species to alfalfa's extracts were *T. incarnatum* and *T. repens* (root and stems extracts), whereas *O. viciifolia* was also sensitive to leaf extract. All species (except *M. sativa*) decreased root growth more than 80 % compared to control. Phytotoxicity detected in different parts of alfalfa will have to be verified under field conditions in order to determine its importance in crop rotations.

Key words: Phytotoxicity, germination, root length.

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios de las plantas y sus productos de degradación son importantes en todos los agroecosistemas, incluyendo los cultivos forrajeros (Miller, 1996). En algunos sistemas agrícolas la presencia de cierta fitotoxicidad explica la interferencia entre cultivos sucesivos o bien entre cultivos y malas hierbas y, por lo tanto, pueden afectar el resultado económico de la producción de materia seca (Putnam y Duke, 1978). La alfalfa (*Medicago sativa* L.) ha sido estudiada tanto por su efecto autotóxico como heterotóxico en otras especies tanto forrajeras como de malas hierbas (Chon y Kim, 2002; Seguin *et al.*, 2002; Koloren, 2007, entre otros), debido a su relevancia dentro del campo productivo. Sin embargo, existe muy poca información sobre cuál es el efecto que tienen las distintas partes de la planta (raíz, tallos y hojas) en esa fitotoxicidad. El análisis de los compuestos aleloquímicos contenidos en cada una de estas fracciones podría ser interesante para contribuir al desarrollo de nuevos herbicidas naturales y productos químicos agrícolas, como desinfectantes e insecticidas (Chung y Miller, 1995a; Xuan y Tsuzuki, 2002). Se conoce que intervienen una serie de compuestos fenólicos hidrosolubles que interaccionan entre sí (Hegde y Miller, 1990) provocando una fuerte fitotoxicidad.

El objetivo principal de este estudio

fue analizar el efecto fitotóxico del tipo de tejido (raíz, tallo y hojas) de *Medicago sativa* y su concentración sobre la reducción de la germinación y longitud radicular de ocho especies de leguminosas forrajeras diferentes que pueden acompañarla en la constitución de praderas o sucederlas en la rotación de cultivos forrajeros.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado para la obtención de los extractos acuosos fue la alfalfa var. Aragón procedente de Gimenez (Lérida) en inicio de floración. En el laboratorio se separaron tres fracciones: raíz, tallo y hojas, que se dejaron secar durante 48 h en una estufa de aire forzado a 60°C y, posteriormente, se molieron con un tamiz de 1 mm. Para cada una de las tres fracciones se obtuvo una solución acuosa mezclando 40 g de material vegetal en un litro de agua destilada, que fue agitado a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, este material se centrifugó a 3000 rpm durante tres horas y el sobrenadante se filtró hasta obtener el extracto acuoso. Las concentraciones utilizadas fueron: 40, 20, 10 y 0 g/l., similares a las utilizadas por otros autores (Chon y Kim, 2002).

Se seleccionaron semillas de ocho leguminosas pratenses, muy utilizadas en cultivos extensivos: *Medicago sativa* L., *Onobry-*

chis viciifolia Scop., *Trifolium repens* L., *T. pratense* L., *T. incarnatum* L., *Vicia sativa* L., *V. villosa* Roth y *Lotus corniculatus* Lam. Se sometieron a un tratamiento de desinfección consistente en una dilución 1:10 de hipoclorito sódico durante 15 minutos y un lavado posterior con agua bidestilada para evitar la presencia de hongos y otros patógenos. Se prepararon placas de petri de 9 cm de diámetro con papel de germinación a las que se añadió 10 ml de extracto acuoso de una sola vez, en las distintas concentraciones y sobre las que se distribuyeron cuidadosamente 50 semillas de cada especie forrajera. Una vez preparadas las placas y selladas con parafilm, se introdujeron en una cámara de germinación a 24°C en periodo diurno (16h de luz) y a 20°C durante el periodo nocturno (8h oscuridad).

Se evaluó el porcentaje de reducción de la germinación respecto a la solución control (a través del número de semillas germinadas) y la reducción de la longitud radicular media por placa de petri al cabo de siete días. Se realizaron cuatro repeticiones por cada una de las concentraciones de los tres extractos acuosos y para cada especie.

El efecto que mostraron los distintos extractos y las diferentes concentraciones sobre la germinación y la elongación radicular en los ocho tipos de semillas fue analizada a través de un análisis de varianza factorial de

tres vías y se utilizó un análisis *post hoc* de diferencia mínima significativa (DMS) para establecer las diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre las medias. Para poder comparar los resultados obtenidos entre las diferentes especies, se calculó el porcentaje de disminución de la germinación en función de cada germinación patrón (0 g/l) para cada especie y lo mismo se efectuó con los datos de longitud radicular. Estos resultados de porcentaje de reducción de la germinación y longitud radicular fueron transformados (arcoseno de la raíz cuadrada) para asegurar las hipótesis de normalidad y homocedasticidad necesarias para el análisis estadístico. Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.15 para llevar a cabo estos análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de la varianza mostraron que tanto la fracción de alfalfa utilizada como extracto, la concentración del mismo y las diferentes especies provocaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$), tanto en la germinación como en crecimiento radicular (Tabla 1). Hemos podido detectar que, con dos de los tres extractos, se llegó a reducir en cerca del 50% la germinación y entre 70 y 80% la longitud radicular media de las especies estudiadas, cuando se considera la concentración más elevada de las ensayadas (Tablas 2 y 3). El incremento en la concentración del extracto, tanto de

raíz, tallo y hojas, afectó significativamente a ambos parámetros ($p < 0,01$), siendo de mayor magnitud el efecto inhibitor que muestra sobre la longitud radicular. De las tres fracciones estudiadas, el extracto de hoja de alfalfa es el que manifestó un mayor grado de inhibición tanto en la germinación como en el crecimiento radicular. A bajas concentraciones (10g/l), la germinación de las leguminosas se vio afectada en mayor medida cuando el extracto se realiza con hojas de alfalfa. Sin embargo, a concentraciones elevadas la disminución de la germinación debida al extracto de hoja es similar a la producida por el extracto de tallo. Por otro lado, el patrón de reducción de la longitud radicular en función del tipo de extracto se mantiene similar en todas las concentraciones, siendo el extracto de la raíz el que produce menores efectos en todos los casos y el de hojas el que produce una mayor inhibición de la elongación radicular.

Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado, ya que otros autores (Chon y Kim, 2002; Xuan y Tsuzuki, 2002; Koloren, 2007) detectaron hasta un 55-56% de reducción de la germinación, según las especies, para extractos de alfalfa. Además Chon y Kim (2002) y Chung y Miller (1995b) ya confirmaron un mayor poder alelopático de las hojas frente a tallos o raíz sobre la germinación de la propia alfalfa y concluyeron que tales diferencias podían estar relacionadas con compuestos alelopáticos que se producen en mayores cantidades en ciertos tejidos. En nuestro trabajo hemos puesto en evidencia el efecto inhibitor de los diferentes tejidos sobre ocho especies diferentes a las empleadas por los autores anteriores. La liberación de estos compuestos fitotóxicos puede verse afectada por el tipo de tejido. En todo caso, consideramos que esta sensible reducción radicular y de viabilidad germinativa detectada en el laboratorio hay que

Tabla 1. Resultados del ANOVA realizado con los porcentajes de reducción de la germinación y de la longitud radicular según la especie forrajera (ocho leguminosas), el extracto de planta utilizado (tres extractos) y la concentración acuosa (tres concentraciones).

| Factores | Germinación | | | Long radicular | |
|------------------------------------|-------------|-------|------|----------------|------|
| | gl | F | Sig. | F | Sig. |
| Extracto | 2 | 10,65 | ** | 360,82 | ** |
| Concentración | 2 | 99,08 | ** | 600,83 | ** |
| Especie | 7 | 46,18 | ** | 135,15 | ** |
| Extracto * Concentración | 4 | 1,46 | NS | 21,29 | ** |
| Extracto * Especie | 14 | 15,17 | ** | 19,77 | ** |
| Concentración * Especie | 14 | 3,78 | ** | 11,41 | ** |
| Extracto * Concentración * Especie | 28 | 1,68 | * | 4,80 | ** |

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, NS: No Significativo

contrastarla en condiciones de campo, donde intervienen un mayor número de variables tanto bióticas como abióticas.

Al desglosar los resultados de la reducción de la germinación, en función de las especies, del tipo de extracto y la concentración utilizada (Tabla 2), se observó que el extracto de raíz modificó de forma importante la germinación de *Trifolium incarnatum*, *Vicia sativa* y *Onobrychis viciifolia*, que a concentraciones elevadas (40 g/l) provocó una reducción superior o cercana al 50%. Por otro lado, el extracto correspondiente al

tallo afectó sobre todo a los tres tréboles (*T. repens*, *T. incarnatum* y *T. pratense*) y a *Vicia villosa* alcanzando reducciones del 92, 75, 64 y 63% respectivamente, también a concentraciones de extracto elevadas. Finalmente, la fracción de hoja de alfalfa produjo reducciones importantes en *T. repens*, *T. incarnatum*, *O. viciifolia* y *V. sativa*. Cabe señalar que, en nuestro caso, la autotoxicidad que se manifestó en la propia alfalfa no alcanzó valores superiores al 10% en ninguno de los tres extractos, siendo una de las especies menos afectada junto a *Lotus corniculatus*. Dichos

Tabla 2. Porcentaje de reducción de la germinación respecto del control (0 g/l) para las distintas especies en función del tipo de extracto acuoso de alfalfa utilizado (raíz, tallo y hoja) y de la concentración. Entre paréntesis error estándar.

| % Reducción Germinación | Raíz | | | Tallo | | | Hojas | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 10 g/l | 20 g/l | 40 g/l | 10 g/l | 20 g/l | 40 g/l | 10 g/l | 20 g/l | 40 g/l |
| <i>M. sativa</i> | 3,00 a (1,81) | 5,00 ab (2,00) | 8,00 b (4,00) | 3,05 a (1,81) | 5,40 ab (2,80) | 8,10 b (4,00) | 3,74 a (2,16) | 3,75 a (1,63) | 3,00 a (0,58) |
| <i>O. viciifolia</i> | 4,03 a (3,71) | 19,55 b (11,84) | 48,51 c (14,64) | 3,22 a (3,22) | 26,24 b (14,62) | 28,71 b (8,56) | 38,71 a (10,03) | 37,90 a (12,73) | 67,74 b (11,48) |
| <i>T. repens</i> | 5,00 a (2,80) | 10,00 a (3,00) | 31,64 b (2,50) | 42,09 a (6,83) | 70,11 b (10,85) | 92,39 c (6,18) | 69,57 a (11,40) | 89,13 b (1,98) | 90,22 b (2,74) |
| <i>T. pratense</i> | 14,13 a (2,74) | 17,93 a (4,01) | 40,22 b (5,36) | 12,46 a (2,55) | 19,88 b (2,67) | 64,46 c (1,15) | 12,05 a (3,48) | 17,47 a (4,33) | 36,14 b (8,94) |
| <i>T. incarnatum</i> | 50,25 a (8,87) | 65,48 a (8,29) | 84,77 b (2,42) | 1,81 a (1,81) | 24,64 b (10,65) | 75,36 c (4,95) | 35,51 a (6,52) | 30,43 a (9,69) | 86,96 b (4,95) |
| <i>V. sativa</i> | 9,42 a (7,21) | 30,07 b (8,37) | 57,97 c (20,13) | 0,00 a (0,00) | 6,82 b (6,82) | 22,73 c (10,82) | 12,50 a (8,17) | 12,50 a (8,17) | 63,64 b (14,25) |
| <i>V. villosa</i> | 9,09 a (3,71) | 10,23 a (3,88) | 21,59 b (3,88) | 27,66 b (8,33) | 9,57 a (2,04) | 63,89 c (14,78) | 7,98 a (4,02) | 13,83 b (8,92) | 13,83 b (2,68) |
| <i>L. corniculatus</i> | 0,00 a (0,00) | 1,58 b (1,50) | 20,24 c (8,54) | 11,56 a (6,03) | 6,92 a (3,10) | 48,51 b (6,20) | 3,22 a (1,62) | 7,61 b (2,03) | 31,04 c (2,75) |
| Media | 10,87 a (3,15) | 18,11 a (4,54) | 38,12 b (5,32) | 12,35 a (2,94) | 20,52 b (4,97) | 49,63 c (5,72) | 22,91 a (4,45) | 26,58 b (5,19) | 49,41 b (6,23) |

Letras diferentes en cada concentración indican diferencias significativas $p \leq 0,01$. Análisis de DMS.

valores fueron ligeramente inferiores a los encontrados por Seguin *et al.* (2002) al estudiar la aleopatía de la alfalfa sobre tres gramíneas (avena, festuca elevada y en maíz), por lo que cabe esperar un menor efecto alelopático sobre las leguminosas.

La longitud radicular de todas las especies analizadas se vio alterada por el efecto alelopático de forma más importante que la observada sobre la germinación. Especialmente intensa fue la reducción que ocasionó el extracto obtenido de las hojas. Dichos resultados, concuerdan con los obtenidos por Seguin *et al.* (2002) donde analizan la longitud

radicular en este caso de 3 gramíneas. Se puede observar en la Tabla 3 que la reducción radicular superó el 80% con extracto de hojas para todas las especies estudiadas a excepción de *Medicago sativa* que presentó una disminución del 40%. *Trifolium repens* y *T. incarnatum* fueron sumamente sensibles a los 3 extractos a concentraciones elevadas, superando el 90% de reducción radicular. Los tres tréboles y la esparceta mostraron una fuerte inhibición con el extracto de tallo de alfalfa: en todos ellos se provocó una disminución superior al 80%. Y finalmente *V. sativa* y *L. corniculatus* tuvieron la misma respuesta

Tabla 3. Porcentaje de reducción de la longitud radicular respecto del control (0 g/l) para las distintas especies forrajeras en función del tipo de extracto acuoso de alfalfa utilizado (raíz, tallo y hoja) y de la concentración. Entre paréntesis error estándar.

| % Reducción Longitud Radicular | Raíz | | | Tallo | | | Hojas | | |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 10 g/l | 20 g/l | 40 g/l | 10 g/l | 20 g/l | 40 g/l | 10 g/l | 20 g/l | 40 g/l |
| <i>M. sativa</i> | 10,41 a (4,50) | 18,06 b (3,85) | 22,30 b (2,73) | 18,30 a (3,10) | 28,84 b (3,85) | 42,27 c (3,94) | 34,97 a (3,26) | 36,25 a (3,28) | 37,04 a (2,16) |
| <i>O. viciifolia</i> | 10,95 a (5,84) | 43,00 b (4,99) | 43,88 b (4,26) | 52,56 a (3,39) | 65,04 b (8,66) | 88,40 c (5,59) | 65,49 a (6,40) | 66,23 a (5,36) | 82,09 b (2,35) |
| <i>T. repens</i> | 33,56 a (2,29) | 74,15 b (0,99) | 93,01 c (0,58) | 53,05 a (3,09) | 89,62 b (2,36) | 92,80 b (2,50) | 63,35 a (3,74) | 84,75 b (1,55) | 93,64 c (1,07) |
| <i>T. pratense</i> | 38,11 a (1,89) | 61,33 b (1,37) | 80,98 c (0,78) | 27,26 a (3,47) | 61,81 b (2,74) | 84,47 c (1,81) | 60,54 a (3,03) | 85,42 b (1,92) | 92,08 c (1,19) |
| <i>T. incarnatum</i> | 18,40 a (3,80) | 31,70 b (2,27) | 90,87 c (0,89) | 41,02 a (3,65) | 51,31 b (3,25) | 90,87 c (1,36) | 65,83 a (7,66) | 84,47 b (5,25) | 92,62 c (1,74) |
| <i>V. sativa</i> | 14,55 a (2,74) | 28,99 b (3,38) | 53,23 c (2,75) | 38,89 a (3,43) | 40,45 a (3,33) | 69,30 b (2,95) | 51,91 a (4,89) | 72,99 b (3,54) | 88,14 c (5,13) |
| <i>V. villosa</i> | 36,93 a (3,32) | 41,20 a (3,17) | 78,97 b (1,26) | 25,35 a (3,89) | 41,70 b (3,84) | 50,24 c (3,54) | 48,29 a (4,30) | 61,12 b (3,75) | 81,30 c (83,61) |
| <i>L. corniculatus</i> | 5,99 a (2,62) | 29,01 b (1,16) | 72,34 c (2,01) | 33,23 a (2,21) | 52,48 b (4,21) | 78,37 c (2,18) | 76,95 a (5,24) | 83,69 ab (3,78) | 88,30 b (3,11) |
| Media | 21,11 a (1,50) | 40,93 b (2,06) | 68,39 c (2,11) | 36,21 a (1,98) | 53,91 b (1,90) | 74,59 c (1,73) | 58,42 a (1,57) | 71,86 b (1,64) | 81,90 c (1,59) |

Letras diferentes en cada concentración indican diferencias significativas $p \leq 0,01$. Análisis de DMS.

que las especies anteriores cuando el extracto correspondió al de hojas.

Hedger y Miller (1990) analizaron las mismas fracciones de alfalfa (raíz, tallo y hojas) sobre alfalfa y sorgo, concluyendo que fueron los extractos de hojas los que afectan sobre todo a la longitud radicular, siendo más importante el efecto sobre el sorgo que sobre la misma alfalfa. Existe poca información sobre el efecto que presenta la alfalfa sobre otras leguminosas forrajeras, por lo que pensamos que estos resultados pueden alentar a continuar con estos trabajos de laboratorio y a trasladarlos a parcelas de campo donde intervienen un mayor número de factores vinculados al suelo y a otros elementos tanto bióticos como abióticos.

CONCLUSIONES

Los efectos alelopáticos provocados por los extractos acuosos de alfalfa se han manifestado de forma más acusada en la longitud radicular que en la germinación de las leguminosas forrajeras experimentadas. La germinación media se ha reducido al 50% al incrementar la concentración de los extractos a 40 g/l, mientras que el crecimiento de la longitud radicular ha disminuido hasta un 80% de media, con respecto a la solución control.

El extracto de raíz afectó a la germinación especialmente de *T. incarnatum*, mos-

trando una reducción superior al 80% cuando la concentración del extracto era elevada. El extracto acuoso de tallos y de hojas además de a esta especie, también afectó fuertemente a la germinación de *T. repens* (92 y 90% respectivamente). La reducción de la longitud radicular se puso de manifiesto con el extracto de hojas de alfalfa, ya que practicante todas las especies excepto la propia alfalfa redujeron su desarrollo en más del 80%.

Esta fitotoxicidad habrá que tenerla en cuenta a la hora de gestionar la rotación de cultivos o las densidades de siembra de los cultivos siguientes por las posibles implicaciones agronómicas, si bien hay que corroborar estos resultados obtenidos en el laboratorio con ensayos de campo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto INIA-RTA2009-00063-C02

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHON S. Y KIM J.D. (2002) Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection*, 21, 1077-1082.

CHUNG I. Y MILLER D. (1995a) Natural herbicide potential of alfalfa residue

on selected weed species. *Agronomy Journal*, 87, 920-925.

CHUNG I. Y MILLER D. (1995b) Effect of alfalfa plant and soil extracts on germination and seedling growth. *Agronomy Journal*, 87, 762-767.

HEDGE R.S. Y MILLER D.A. (1990) Allelopathy and autotoxicity in alfalfa: characterization and effects of preceding crops and residue incorporation. *Crop Science*, 30, 1255-1259.

KOLOREN O. (2007) Allelopathic effects of *Medicago sativa* L. and *Vicia cracca* L. leaf and root extracts on weeds. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 10, 1639-1642.

MILLER D.A. (1996) Allelopathy in forage crop systems. *Agronomy Journal*, 88, 854-859.

PUTNAM A.R. Y DUKE W. (1978) Allelopathy in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 16, 431-451.

SEGUIN P., SHEAFFER C.C., SCHMITT M.A., RUSSELLE M.P., RANDALL G.W., PETERSON P.R., HOVERSTAD T.R., QUIRING S.R. Y SWANSON D.R. (2002) Alfalfa autotoxicity: effects of residing delay, original stand age, and cultivar. *Agronomy Journal*, 94, 775-778.

XUAN T.D. Y TSUZUKI E. (2002)

Varietal differences in allelopathic potential of alfalfa. *Journal Agronomy and Crop Science*, 188, 2-7.