

Se ha podido comprobar el efecto autotóxico que presenta la esparceta provocando una reducción de la germinación (cerca de 50% en esparcetas de procedencia Jarque) y 37% sobre la longitud radicular. El efecto sobre el crecimiento radicular de *Trifolium repens* y *T. pratense* es aun más importante ya que se reduce un 75% a concentraciones elevadas. La alelopatía que produce el extracto de esparceta sobre las tres gramíneas estudiadas se pone de manifiesto a concentraciones elevadas llegando a ser importantes en *Lolium multiflorum* y *L. perenne* con una reducción de la raíz cercanas al 80%.

Consideramos que hay que tener en cuenta esta fitotoxicidad 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 muestreos de campo.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANALS R.M., SAN EMETERIO L. Y PERALTA J. (2005) Autotoxicity in *Lolium rigidum*: analyzing the role of chemically mediated interactions in annual plant populations. *Journal of Theoretical Biology*, **235**, 402-407.
- CHON S. (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. (1995). Natural herbicide potencial of alfalfa residue on selected weed species. *Agronomy Journal*, **87**, 920-925
- DELGADO I., ANDRES C., SIN E. Y OCHOCA M.J. (2002) Estado actual del cultivo de la esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Encuesta realizada a agricultores y productores de semilla. *Pastos*, **32** (2), 235 – 247.
- I.S.T.A. (2006) *International rules for seed testing*. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- 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.
- LI R. (2009) Allelopathy of root exudates of *Onobrychis viciaefolia* on 7 kinds of weed. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, **15**, 7059-7061.
- PUTNAM A.R. Y DUKE W. (1978) Allelopathy in agroecosystems. *Annual review of Phytopathology* **16**, 431-451.
- SAN EMETERIO L., ARROYO A. Y CANALS R.M. (2004) Allelopathic potential of *Lolium rigidum* Gaud. on the early growth of three associated pasture species. *Grass and Forage Science*, **59**, 107-112.
- SEGUIN P. (2002) Alfalfa autotoxicity: Effects of residing delay, original stand age, and cultivar. *Agronomy Journal*, **94**, 775-778.
- SMITH A. Y MARTIN L. (1994) Allelopathic characteristics of grass weeds in the forage ecosystem. *Agronomy Journal*, **86**, 243-246.
- XUAN T. (2002) Varietal differences in allelopathic potencial of alfalfa. *Journal Agronomy and Crop Science*, **188**, 2-7.

Efecto del estrés hídrico sobre el contenido de compuestos fenólicos en *Festuca rubra*

Effect of drought stress on phenolic compounds of *Festuca rubra*

B.R. VÁZQUEZ DE ALDANA / B. GONZÁLEZ RODRÍGUEZ /
A. GARCÍA CIUDAD / A. ÁLVAREZ PASCUA / B. GARCÍA CRIADO

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca.
beatriz.dealdana@irna.es

Resumen: Los compuestos fenólicos y flavonoides son los metabolitos secundarios de más amplia distribución en las plantas. Tienen un importante papel en procesos fisiológicos y ecológicos y están involucrados en la resistencia de las plantas a distintos tipos de estreses. Además tienen propiedades antioxidantes de interés para la industria alimentaria. *Festuca rubra* es una gramínea perenne frecuente en los pastos de dehesa en la provincia de Salamanca. En este ambiente semiárido, las plantas tienen que soportar una larga sequía estival. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del estrés hídrico sobre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de *Festuca rubra*. Se diseñó un ensayo en invernadero con dos ecotipos de *F. rubra* (ambos infectados por el hongo endofítico *Epichloë festucae*) y tres niveles de disponibilidad de agua. El efecto del estrés hídrico dependió del ecotipo considerado. En uno de los ecotipos se observó una disminución significativa de la producción de biomasa en hojas y raíces al aumentar el nivel de estrés. El incremento de estrés hídrico produjo además una disminución del contenido de fenoles totales y flavonoides en raíces, en el nivel más alto de estrés, mientras que la concentración de compuestos fenólicos totales en hojas no varió de forma significativa.

Palabras clave: flavonoides, gramíneas, raíces, biomasa, sequía.

Abstract: Phenolic compounds and flavonoids are among the most widely distributed secondary metabolites in the plant kingdom. They play an important role in physiological and ecological processes and they are involved in plant resistance to different types of stress. They also have antioxidant properties of interest to the food industry. *Festuca rubra* is a perennial grass common in pasture grasses in the province of Salamanca. In this semiarid environment, plants have to endure a long summer drought. The objective of this research was to determine the effect of water stress on the content of phenolic compounds in plants of *F. rubra*. We designed a greenhouse trial with two ecotypes of *F. rubra* (both infected with endophytic fungus *Epichloë festucae*) and three levels of water availability. The effect of water stress depended on the ecotype considered. In one of the ecotypes, the increase of water stress level produced a significant decrease in biomass production in leaves and roots. The increase of water stress also produced a decrease in total phenolic compounds and flavonoid contents in roots, while the concentration of phenolic compounds in leaves did not vary significantly.

Key words: flavonoids, grasses, root biomass, red fescue.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos y flavonoides son los metabolitos secundarios de más amplia distribución en las plantas. Tienen un importante papel en procesos fisiológicos y ecológicos y están involucrados en la resistencia de las plantas a distintos tipos de estrés (Treutter, 2005). Estos metabolitos tienen varias funciones de defensa y por tanto su biosíntesis en las plantas está inducida generalmente en respuesta a estímulos abióticos y bióticos como sequía, ozono, radiación UV, metales pesados o ataque de patógenos (Waterman y Mole, 1994). Por otro lado, los compuestos fenólicos tienen un papel importante en las interacciones planta-herbívoro incluyendo efecto insecticida, estimulación herbivorismo, toxicidad y resistencia a enfermedades. Aunque tradi-

cionalmente se ha considerado que algunos compuestos fenólicos (p.e. taninos) pueden ser perjudiciales en nutrición animal por su capacidad de precipitar las proteínas, estudios recientes muestran beneficios en rumiantes (Salminen y Karonen, 2011). Los compuestos fenólicos se acumulan en la planta en sitios estratégicamente importantes donde pueden tener un papel directo o de señalización en la defensa (Treutter, 2005), localizándose en muchos casos en las raíces de las plantas (Saviranta *et al.*, 2010).

El hecho de que los compuestos fenólicos puedan tener un papel en la resistencia de la planta a distintos estreses, motivó a plantearse el objetivo de este trabajo: determinar qué efecto tiene el estrés hídrico en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides en plantas de *Festuca rubra*. Esta gramínea perenne es frecuente en pastos de dehesa de la provincia de Salamanca, caracterizados principalmente por un clima semiárido, donde las plantas están sometidas a estrés hídrico con frecuencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se llevó a cabo un ensayo en invernadero con plantas de *Festuca rubra* infectadas por el hongo endofítico *Epichloë festucae*, utilizando dos líneas de esta gramínea (P y R). El hecho de utilizar plantas infectadas por el endófito *E. festucae* es debido a que una media del 70% de las plantas de esta gramínea están infectadas de forma natural y asintomática en los pastos de dehesa de la provincia de Salamanca (Zabalgogea *et al.*, 1999). A partir de semillas de plantas recogidas en las dehesas y mantenidas en finca experimental, se obtuvieron plantas que se mantuvieron en macetas en invernadero durante seis meses. En ese momento, las plantas se dividieron en clones, cada una con dos vástagos y se recortó la raíz a una longitud aproximada de 4 cm para obtener plantas de tamaño similar. Se trasplantaron de forma individual a macetas con una mezcla de turba y vermiculita, donde se mantuvieron durante 14 semanas con riegos frecuentes antes de iniciar el tratamiento de estrés hídrico.

Diseño experimental

El tratamiento consistió en tres niveles de estrés hídrico basados en la frecuencia de riego de las plantas: W1 = riego cada 7 días; W2 = riego cada 15 días; C = riegos tres veces por semana. Se realizaron dos ciclos de déficit hídrico, dejando tres semanas de recuperación entre ambos ciclos en las que se efectuaron riegos alternos en todas las macetas. Se aplicó un diseño factorial considerándose seis réplicas de cada combinación tratamiento (C, W1 y W2), y línea de *F. rubra* (P y R). Se colocaron las macetas al azar en el invernadero y se rotaron periódicamente. El ensayo se llevó a cabo en condiciones de T= 22°C/15°C día/noche, y luz natural en primavera. Después de las siete semanas que duró el tratamiento completo, las plantas se cortaron, separando raíces y parte aérea, determinando el peso seco en las muestras liofilizadas.

Análisis químico

Se realizó una extracción con 5 ml de MeOH:H₂O (50:50) sobre 200 mg de muestra liofilizada y molida, durante 30 minutos. Se separó el extracto, mediante centrifugación y posterior filtración. Estos extractos se mantuvieron en el congelador (-30°C) para los análisis químicos posteriores de compuestos fenólicos y flavonoides.

El contenido total de compuestos fenólicos (CFT) se determinó mediante el método colorimétrico de Price (Graham, 1992) por reacción con ferricianuro potásico, utilizando ácido gálico como patrón de referencia para la cuantificación. El contenido total de flavonoides se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Heimler *et al.* (2005), utilizando catequina como patrón de referencia.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza considerando como factores tratamiento de estrés hídrico (C, W1 y W2) y línea de *F. rubra* (P y R), utilizando el programa estadístico SPSS v17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa aérea y subterránea

Ambos ecotipos de *F. rubra* presentan una distribución de biomasa diferente, así la producción de hojas del ecotipo P fue significativamente (P<0,001) mayor que la de R, sin embargo respecto a la producción de raíces fue mayor (P<0,001) en R que en P (fig. 1). Considerando la biomasa total, el efecto del ecotipo no fue significativo pero hay una interacción significativa con el tratamiento que discutiremos más adelante (tabla 1).

El tratamiento de estrés hídrico tuvo un efecto significativo en la producción de biomasa de las plantas de *F. rubra* (tabla 1). El peso seco de las hojas disminuyó de forma significativa (P<0,01) al aumentar el nivel de estrés. La variación en el peso seco de las raíces se vio afectada por la interacción entre el tratamiento de estrés hídrico y el ecotipo: en el ecotipo R al aumentar el nivel de estrés disminuyó la producción de biomasa en la raíz, sin embargo, en el ecotipo P las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas (fig. 1). La proporción de biomasa hojas:raíz difiere entre ecotipos, pero no varía con el estrés hídrico (fig. 1, tabla 1).

En general, el ecotipo P tiene pocas variaciones en biomasa (hojas o raíces) con el tratamiento hídrico. Sin embargo, en R, con mayor producción de raíces que de hojas, al aumentar el nivel de estrés hídrico disminuye la producción de biomasa tanto en hojas como en raíces, siendo más acusada la disminución en raíces. Esos resultados pueden resultar sorprendes, ya que una mayor producción de raíces implicaría una mayor capacidad de absorción de agua y por tanto la planta estaría menos afectada por el estrés hídrico. Sin embargo sucede lo contrario, lo que indica que pudieran existir diferencias en la morfología de la raíz que hacen que el ecotipo P sea más eficiente en la absorción de agua.

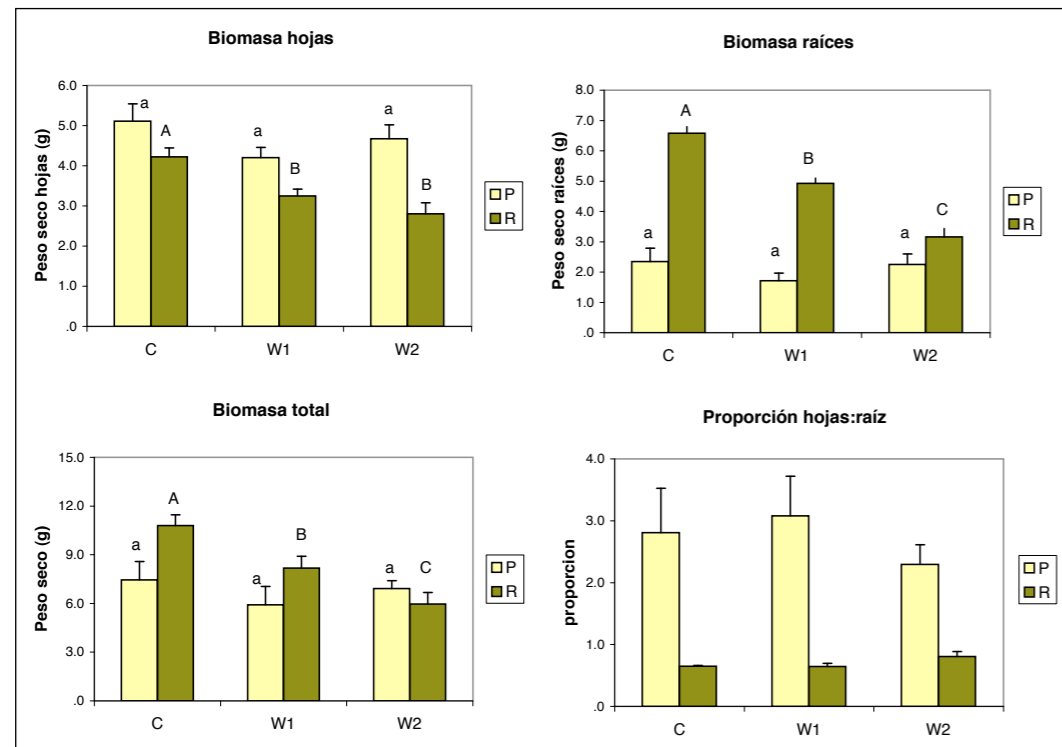


Figura 1. Producción de biomasa en hojas, raíces y total (g peso seco) y proporción hojas: raíces (media ± error estándar) de plantas de *F. rubra*, de dos ecotipos (P y R), sometidas a distintos niveles de estrés hídrico (C, W1, W2). Para cada ecotipo, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos a $P < 0,05$.

Considerando la biomasa total, el estrés hídrico disminuye de forma significativa en R, pero en P las diferencias entre los tratamientos C y W2 no fueron significativas.

Tabla 1. Nivel de significación del ANOVA del efecto del tratamiento de estrés hídrico (T) y el ecotipo de la planta (E), sobre distintos parámetros analizados en muestras de hojas y raíces de plantas de *F. rubra*.

	Tratamiento (T)	Ecotipo (E)	T × E
Biomasa hojas	0,004	0,000	0,199
Biomasa raíces	0,005	0,000	0,007
Biomasa total	0,005	0,109	0,027
Proporción hojas: raíz	0,738	0,000	0,484
Fenoles hojas	0,759	0,693	0,724
Fenoles raíces	0,003	0,000	0,050
Flavonoides hojas	0,019	0,003	0,127
Flavonoides raíces	0,001	0,000	0,322

Compuestos fenólicos

En la figura 2 se muestran los resultados de los análisis de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides. Ambos ecotipos difieren en la concentración de estos metabolitos secundarios, que en general es mayor en P que en R.

En relación al contenido de CFT en hojas no se encontraron variaciones significativas entre tratamientos de estrés hídrico o ecotipos de *F. rubra* (tabla 1). Sin embargo, en raíces, al aumentar el nivel de estrés hídrico disminuyó el contenido de CFT en ambos ecotipos. Es de destacar el incremento significativo en el nivel W1 respecto al control en el ecotipo P (fig. 2). En el caso del contenido total de flavonoides en hojas, se encontró un efecto del tratamiento hídrico, con disminución significativa entre el control y el nivel W2 (fig. 2). En raíces las variaciones fueron similares a las que se producen en las hojas, aunque en este caso la disminución en el nivel W2 fue mucho más acusada.

Analizando los resultados obtenidos en general, vemos que si bien la concentración de flavonoides es mayor que la de CFT, ambos presentan una tendencia paralela, principalmente en raíces. Por otro lado, si analizamos las hojas de *F. rubra* vemos que la variabilidad obtenida en los fenoles totales es mucho menos pronunciada que en flavonoides.

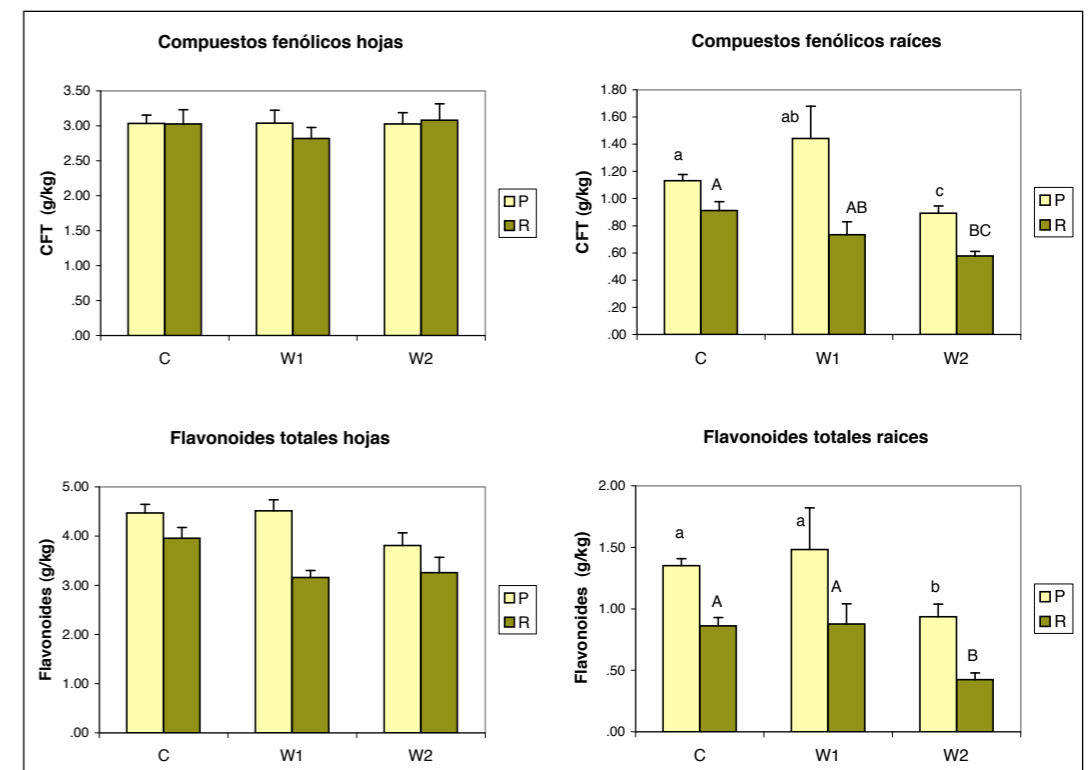


Figura 2. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales (media ± error estándar) en plantas de *F. rubra*, de dos ecotipos (P y R), sometidas a distintos niveles de estrés hídrico (C, W1, W2). Para cada ecotipo, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos a $P < 0,05$.

Mientras que el estrés hídrico tiene un efecto pronunciado en la producción de biomasa del ecotipo R, la variación del contenido de compuestos fenólicos con el estrés hídrico es similar en ambos ecotipos, disminuyendo en ambos casos con el nivel más alto W2. Sobre el efecto del estrés hídrico en el contenido de compuestos fenólicos en plantas, hay casos descritos en los que su concentración en la parte aérea aumenta al aumentar el déficit hídrico en plantas como *Salvia officinalis* (Bettaieb *et al.*, 2011). La disminución de flavonoides y CFT al aumentar el déficit hídrico encontrada en este trabajo indica que no tienen ningún papel en la resistencia de la planta a este tipo de estrés.

CONCLUSIONES

Ambos ecotipos difieren tanto en la distribución de biomasa en hojas y raíces, y en el contenido de CFT y flavonoides.

La respuesta al estrés hídrico en producción de biomasa es diferente en ambos ecotipos: el ecotipo con mayor proporción de biomasa en raíces es el que acusa una disminución al aumentar el estrés hídrico. Sin embargo, la concentración CFT y flavonoides disminuye en ambos ecotipos en el nivel más alto de estrés.

El papel de los compuestos fenólicos y flavonoides no parece ser relevante en la resistencia al estrés hídrico de *Festuca rubra*, en las condiciones en las que se realizó el ensayo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto AGL2008-01159. La participación de Beatriz González Rodríguez fue posible gracias a una beca JAE-Intro del CSIC (beca de Introducción a la Investigación). Se agradecen los comentarios de un revisor anónimo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTAIEB I., HAMROUNI-SELLAMI I., BOURGOU S., LIMAM F. Y MARZOUK B. (2011) Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 1103-1111.
- GRAHAM H.D. (1992) Stabilization of the prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **40**, 801-805.
- HEIMLER D., VIGNOLINI P., DINI M.G. Y ROMANI A. (2005) Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 3053-3056.
- SALMINEN J.P. Y KARONEN M. (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*, **25**, 323-338.

- SAVIRANTA N.M.M., JULKUNEN-TIITTO R., OKSANEN E. Y KARJALAINEN R.O. (2010) Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: root phenolic compounds affected by biotic and abiotic stress factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 418-423.
- TREUTTER D. (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, **7**, 581-591.
- WATERMAN P.G. Y MOLE S. (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. London, UK: Blackwell Scientific Publications.
- ZABALGOGEAZCOA I., VAZQUEZ-DE-ALDANA B.R., GARCIA-CRIADO B. Y GARCIA-CIUDAD A. (1999) The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, **54**, 91-95.