

Potencial Alelopático de extractos foliares de *Astragalus mollissimus* Torr. sobre la germinación *in vitro* de semillas de maleza*

Allelopathic potential of leaf extracts from *Astragalus mollissimus* Torr. on *in vitro* germination of weed seeds

María Antonia Flores Córdova^{1§}, Esteban Sánchez Chávez¹ y Ramona Pérez Leal²

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Delicias, Av. Cuarta Sur Núm. 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto Delicias Chihuahua, México. C. P. 33089. Teléfono: 52 639 474-8704. (esteban@ciad.mx). ²Facultad de Ciencias Agrotecnológicas-Universidad Autónoma de Chihuahua. Av. Escorza Núm. 900, Chihuahua, Chihuahua. México. C. P. 31200. Teléfono: 52 614-439-1844. (perezleal@hotmail.com). [§]Autora para correspondencia: mariflor_556@hotmail.com.

Resumen

Astragalus mollissimus Torr. es una de las plantas tóxicas más importantes en los pastizales del desierto chihuahuense, tóxica para el ganado que la consume, debido a la presencia de metabolitos secundarios alcaloidales tales como swainsonina; sin embargo, no se tiene conocimiento de la existencia de trabajos anteriores sobre su efecto alelopático. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad alelopática en semillas de *Lactuca vitrosa*, *Sorghum halepense*, *Lolium multiflorum*, *Arundo donax* y *Medicago sativa*, las pruebas se realizaron con diferentes concentraciones 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 % (v/v) de extractos acuosos de, diclorometano, acetona y metanol, obtenido de la flor, mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación total (Gt) y velocidad de germinación acumulada (VGA). Se demostró que los extractos orgánicos fueron más fitotóxicos que el extracto acuoso, en la inhibición de la germinación de las semillas de, Carrizo y Jhonson. Por lo tanto, los extractos ensayados de *A. mollissimus* permitieron detectar la actividad alelopática para su posible desarrollo como herbicida natural.

Palabras clave: Carrizo, Jhonson, Raygrass, alfalfa, hierba loca, lechuga.

Abstract

Astragalus mollissimus Torr is one of the most important toxic plants in the Chihuahuan desert grasslands, toxic to livestock that consume it, due to the presence of alkaloidal secondary metabolites such as swainsonine; however, there is no existence of previous work on its allelopathic effect. The aim of this study was to evaluate the allelopathic activity in seeds of *Lactuca vitreous*, *Sorghum halepense*, *Lolium multiflorum*, *Arundo donax* and *Medicago sativa*, tests were performed with different concentrations 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5% (v/v) of aqueous extracts of dichloromethane, acetone and methanol, obtained from the flower by evaluating the effect thereof on total germination (Gt) and accumulated germination rate (VGA). It showed that organic extracts were more phytotoxic than the aqueous extract, in the inhibition of seed germination from, Reed and Johnson. Therefore, the tested extracts of *A. mollissimus* allowed detecting allelopathic activity for its possible development as natural herbicide.

Keywords: Reed, Johnson, Raygrass, alfalfa, locoweed, lettuce.

Introducción

La agricultura moderna depende de una alta utilización de insumos. Esta dependencia ha llevado a una excesiva utilización de fertilizantes, plaguicidas, fungicidas y herbicidas, que a largo plazo generan un impacto ambiental negativo (Oliva y Peña, 2004). Entre los insumos más utilizados se encuentran los herbicidas, que representan aproximadamente 43% del total de las ventas de plaguicidas a nivel mundial (Kogan y Pérez, 2003). El uso constante de herbicidas puede alterar el medio ambiente, la biodiversidad del suelo, la salud humana provocando intoxicaciones agudas, crónicas y malformaciones genéticas (Oliva y Peña, 2004).

Una alternativa natural y acorde con el medio ambiente a este tipo de insumos agrícolas, es la alelopatía. El fenómeno de la alelopatía, es definido, como el proceso por el cual una planta desprende al medio ambiente (Pazmiño, 1999, Larrea-Alcazar, 2003), una cantidad apreciable de compuestos biológicamente activos y algunos de ellos actúan como inhibidores o estimuladores de la germinación de las semillas las cuales afectan o benefician el crecimiento de las plantas (Isaza *et al.*, 2007). Entre las sustancias con actividad alelopática se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides, alcaloides y quinonas, los cuales están prácticamente en todos los tejidos vegetales y semillas de la planta (Rodríguez *et al.*, 2002; Rabotnikof *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007).

Las plantas sintetizan diferentes metabolitos semejantes a la acción de los químicos sintéticos con la ventaja de ser biodegradables, un ejemplo de esto son los aleloquímicos, productos que por su naturaleza orgánica, se consideran saludables para el consumidor y el medio ambiente (Rizvi y Rizvi, 1992). La mayoría de estos agentes alelopáticos o aleloquímicos son sintetizados por las plantas, derivados de las rutas del acetato-mevalonato o del ácido shikímico (Piñol *et al.*, 2008).

Los metabolitos secundarios con efecto alelopático se han convertido en una fuente de nuevos herbicidas con novedosas estructuras y mecanismos de acción (Gliessman, 2002), por consiguiente la búsqueda y desarrollo de nuevos agroquímicos ha puesto especial atención al fenómeno de la alelopatía y a los metabolitos secundarios involucrados en este fenómeno (Ávila *et al.*, 2007) con el fin de preservar el medio ambiente y contribuir a una agricultura sustentable (Cabral *et al.*, 2008).

Introduction

Modern agriculture depends on high input use. This dependence has led to excessive use of fertilizers, pesticides, fungicides and herbicides, which generate long term negative environmental impact (Oliva and Peña, 2004). Among the most used inputs are herbicides, representing approximately 43% of total pesticide sales worldwide (Kogan and Perez, 2003). The constant use of herbicides can alter the environment, soil biodiversity, human health, causing acute poisoning, chronic and genetic malformations (Oliva and Peña, 2004).

A natural alternative and consistent to the environment, this type of agricultural inputs is allelopathy. The phenomenon of allelopathy, is defined as the process by which a plant releases to the environment (Pazmiño, 1999, Larrea-Alcazar, 2003), an appreciable amount of biologically active compounds and some of them act as inhibitors or stimulators of seed germination, which affect or benefit the growth of plants (Isaza *et al.*, 2007). Among the substances with allelopathic activity are phenolic acids, flavonoids, terpenoids, alkaloids, quinones, which are virtually all plant tissues and seed plants (Rodríguez *et al.*, 2002; Rabotnikof *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007).

Plants synthesize different metabolites similar to the action of synthetic chemicals with the advantage of being biodegradable, an example of this are the allelochemicals, products whose organic nature, are considered healthy for the consumer and the environment (Rizvi and Rizvi, 1992). Most of these allelopathic or allelochemical agents are synthesized by plants, derived from acetate-mevalonate pathways or from shikimic acid (Piñol *et al.*, 2008).

Secondary metabolites with allelopathic effect have become a source of new herbicides with novel structures and mechanisms of action (Gliessman, 2002), therefore the search and development of new agrochemicals has paid special attention to the phenomenon of allelopathy and to secondary metabolites involved in this phenomenon (Ávila *et al.*, 2007) in order to preserve the environment and contribute to sustainable agriculture (Cabral *et al.*, 2008).

Therefore, it has been promoted the use of allelopathic compounds in germinated seeds, seedlings in development or in field, as studies on sunflower suggesting alkaloids,

Por lo tanto, se ha promovido el uso de compuestos alelopáticos en semillas germinadas, plántulas en desarrollo o en campo, como los estudios sobre flores de girasol donde sugieren alcaloides chalconas y flavonoides como agentes alelopáticos, entre estos se encuentran kulkulkanin que afecta germinación y tambulinque que afecta principalmente crecimiento en plántulas (Isaza *et al.*, 2007). Los fenólicos estimulan a la AIA-oxidasa destruyendo a la hormona fundamental ácido indolacético (AIA) o auxina, en tanto que los terpénicos interfieren con las enzimas respiratorias con el grupo SH como se ha comprobado para la juglona.

En años recientes se ha informado de la acción inhibitoria de la isoalantolactona de *Imula* sp., sobre el quelite (*Amaranthus*) y el chual (*Chenopodium*) y del extracto acuoso de *Ambrosia artemisifolia* sobre el quelite y otras dicotiledóneas. También son inhibitorios los extractos acuosos del zacate Bermuda (*Cynodon dactylon*) y del zacate Jhonson (*Sorghum halepense*), que afectan el desarrollo radicular, peso seco de la plántula y respiración en semillas de frijol, trigo, avena y sorgo (Rojas y Gámez, 2002).

Entre otros se cita la utilización de cultivos de supresión o cubiertas alelopáticas vegetales y uso de extractos fitotóxicos de plantas alelopáticas (Bensch *et al.*, 2007), otros más se han centrado en los efectos alelopáticos que algunos cultivos podrían tener sobre malezas (Zamorano y Fuentes, 2005). Al respecto, Duke *et al.* (2002) afirman que hay muchos materiales y compuestos que se pueden obtener de productos naturales utilizados directamente o como base para el desarrollo de moléculas herbicidas y cuyo potencial para el manejo de malezas ha sido documentado (Zamorano y Fuentes, 2005).

La gran diversidad de plantas alelopáticas justifica la necesidad de investigar otras especies que nunca han sido estudiados, como *Astragalus mollissimus* Torr., planta perene, leguminosa nativa de los pastizales medianos del norte de México, relativamente libre de enfermedades, plagas y malas hierbas, conocida como hierba loca, chinchines o sonadora (Ezedowski y Rzedoeski, 2001) de naturaleza tóxica asociada a la presencia de un alcaloide indolizidinico denominado swainsonina, que es un potente inhibidor de las enzimas alfa-golgi lisosomal α -mannosidasa y mannosidasa II (Pfister *et al.*, 2007), el cual genera toxicidad para el ganado, ovejas, cabras y caballos en particular que la consumen (Zeinsteger *et al.*, 2003), el alcaloide está presente en todas las partes de la planta (knight y Walter, 2003) y es tóxica durante cualquier etapa de crecimiento, incluso cuando se seca (Wolfe y Lance 1984).

chalcone and flavonoids as allelopathic agents, among these are kulkulkanin affecting germination and tambulin affecting seedling growth (Isaza *et al.*, 2007). Phenolic compounds stimulate IAA -oxidase destroying the fundamental hormone indoleacetic acid (IAA) or auxin, whereas terpene interfere with respiratory enzymes with the SH group as shown for juglone.

In recent years it has been reported the inhibitory action of isoalantolactone from *Imula* sp., on pigweed (*Amaranthus*) and melde (*Chenopodium*) and from the aqueous extract of *Ambrosia artemisifolia* on pigweed and other dicots. Also inhibitory aqueous extracts of Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) and Johnson grass (*Sorghum halepense*), which affect root development, seedling dry weight and respiration in bean, wheat, oats and sorghum seeds (Rojas and Gámez, 2002).

Among others are cited the use of crop suppression or allelopathic ground cover and use of phytotoxic extracts from allelopathic plants (Bensch *et al.*, 2007), others have focused on the allelopathic effects that some crops could have on weeds (Zamorano and Fuentes, 2005). In this regard, Duke *et al.* (2002) state that there are many materials and compounds that can be obtained from natural products used directly or as basis for the development of herbicide molecules and whose potential for weed control has been documented (Zamorano and Power, 2005).

The great diversity of allelopathic plants justifies the need to investigate other species that have never been studied, like *Astragalus mollissimus* Torr., perennial plant, native legume of medium pastures from northern Mexico, relatively free of diseases, pests and weeds, known locoweed, chinchines or sonadora (Ezedowski and Rzedoeski, 2001) toxic nature associated to the presence of an indolizidine alkaloid called swainsonine, which is a potent inhibitor of alpha-golgi lysosomal α -mannosidase enzymes and mannosidase II (Pfister *et al.*, 2007), which generates toxicity to cattle, sheep, goats and horses in particular when consumed (Zeinsteger *et al.*, 2003), the alkaloid is present in all parts of the plant (Knight and Walter, 2003) and it is toxic at any stage of growth, even dry (Lance and Wolfe, 1984).

The phytotoxic properties have been detected in many types of alkaloids; but the mechanisms that justify the allelopathic activity have not yet been studied. However, alkaloids are compounds which affect and inhibit DNA and

Las propiedades fitotóxicas han sido detectadas en numerosos tipos de alcaloides; pero los mecanismos que justifican la actividad alelopática aún no han sido estudiados. Sin embargo, los alcaloides son compuestos que afectan e inhiben la actividad del ADN y ARN, de algunas enzimas, la biosíntesis de proteínas y la permeabilidad de las membranas, perturbando su estabilidad (Wink y Latz, 1995). Asimismo, los alcaloides son uno de los más diversos grupos de metabolitos secundarios. Se producen por una gran variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales. Los alcaloides son tóxicos en la naturaleza y ayudan a las plantas, para protegerse de sus enemigos o competidores y facilitar su propia supervivencia en los ecosistemas. En las plantas, los alcaloides funcionan como compuestos alelopáticos, y esta propiedad hace que algunas de las plantas posean un potencial herbicida natural (Goyal, 2013) por lo cual *A. mollisimus* pudiera ser considerada con efecto alelopático (Figura 1).

Sin embargo no existe información sobre el efecto que tiene la planta o sus partes, que provoquen una fitotoxicidad, convirtiéndose en una planta interesante de investigación como agente alelopático (Saucedo, 2008).

Con base en lo anterior, y con el fin de proporcionar antecedentes alelopáticos de *A. mollisimus*, el objetivo de esta investigación consistió en evaluar la actividad alelopática de tres extractos de diferente polaridad acetona, diclorometano y metanol, obtenidos de la flor de la especie de *A. mollisimus* Torr., en semillas de lechuga silvestre (*Lactuca vitrosa*), zacate Raygrass (*Lolium multiflorum*) zacate Jhonson (*Sorghum halepense*) zacate Carrizo (*Arundo donax*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

Materiales y métodos

Recolecta del material vegetal

Las flores de *A. mollisimus* Torr. fueron recolectadas en el predio denominado Teseachi del Municipio de Bachiniva del Estado de Chihuahua, región de clima semiárido o semicálido, con una latitud 28° 47' 26.56"; y una longitud de 107° 16' 34.55", con una temperatura promedio anual de 13.6 °C y precipitación total anual de 449 mm. El material vegetal fue clasificado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

RNA activity of some enzymes, protein biosynthesis and permeability of membranes, disturbing its stability (Wink and Latz, 1995). Also, alkaloids are one of the most diverse groups of secondary metabolites; are produced by a variety of organisms, including bacteria, fungi, plants and animals; the alkaloids are toxic in nature and help plants to protect themselves from their enemies or competitors and facilitate their own survival in the ecosystem. In plants, alkaloids act as allelopathic compounds and this property makes some plants possess a natural herbicide potential (Goyal, 2013) and therefore *A. mollisimus* could be considered with allelopathic effect (Figure 1).

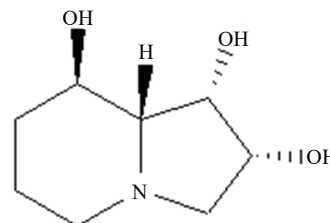


Figura 1. Swansonina, es un derivado de la indolizidina que actúa como alcaloide (Panter *et al.*, 2002).

Figure 1. Swansonina is a derivative from indolizidine which acts as alkaloid (Panter *et al.*, 2002).

However there is no information on the effect that the plant or its parts cause phytotoxicity, becoming an interesting plant for research as allelopathic agent (Saucedo, 2008).

Based on the above, and in order to provide allelopathic background of *A. mollisimus*, the objective of this research was to evaluate the allelopathic activity of three extracts with different polarity acetone, dichloromethane and methanol, obtained from the flower of *A. mollisimus* Torr., in seeds of wild lettuce (*Lactuca vitrosa*) Raygrass grass (*Lolium multiflorum*) Johnson grass (*Sorghum halepense*) Reed grass (*Arundo donax*) and alfalfa (*Medicago sativa*).

Material and methods

Collection of plant material

Flowers of *A. mollisimus* Torr. were collected at the site called Teseachi from the Bachiniva municipality, Chihuahua state, semiarid or warm climate, at latitude 28° 47' 26.56 " and a longitude 107 ° 16 '34.55 ", with an annual average temperature of 13.6 °C and annual rainfall of 449 mm. The

Preparación del material vegetal

El material vegetal colectado se lavó con agua a chorro y se secó a temperatura ambiente sobre papel estraza, para que absorbiera la humedad y se removió cada 24 h, para evitar la formación de hongos. Posteriormente se secó el órgano flor en una estufa marca Felisa durante cinco días a una temperatura de 45 °C para eliminar toda la humedad y se molió en un molino eléctrico Willey modelo 4, hasta convertirlo en polvo fino.

Preparación de los extractos

Se llevó a cabo mediante la metodología establecida por Pérez-Leal *et al.* (2005), para la preparación de los extractos orgánicos se realizó la maceración de la flor con tres materiales de extracción como solventes, acetona, diclorometano y metanol de diferente polaridad, durante ocho días a temperatura ambiente. Las disoluciones se filtraron con papel filtro Wattman, con el fin de separar el extracto del material vegetal restante. Los extractos crudos se obtuvieron concentrando a presión reducida en un rotavapor. Para preparar los extractos acuosos se maceró el material vegetal flor, durante 24 h. Posteriormente se preparó la solución madre a partir del extracto crudo de flor, de la cual se tomaron las concentraciones a utilizar de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5%.

Preparación de los tratamientos

Para los extractos orgánicos y acuosos se prepararon seis disoluciones de diferente concentración, al 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5% y como testigo se utilizó solamente solvente puro o agua destilada según correspondiera.

Bioensayos *in vitro*

A las semillas utilizadas para este bioensayo se le realizaron previamente pruebas y se seleccionaron aquellas que tuvieran 95% de viabilidad. El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, según el método descrito por Pérez-Leal *et al.* (2005). En cajas petri de 10 cm de diámetro se colocó papel filtro Wattman Núm.1, adicionándose por separado 2.5 ml de cada concentración de los extractos acuosos de flor, se distribuyeron 50 semillas de cada especie, utilizándose como testigo agua destilada. Una vez preparadas las placas y selladas con parafilm, se introdujeron a una cámara de germinación a 24 °C en periodo diurno (16 h de luz) y a 20 °C durante el

plant material was classified in the Herbarium of the Faculty of Agro-technological Sciences from the Autonomous University of Chihuahua.

Preparation of plant material

The collected plant material was washed with tap water and dried at room temperature on kraft paper to absorb the moisture and stirred every 24 h, to avoid fungus formation. Then flower organ was dried in a Felisa oven for five days at a temperature of 45 °C to remove all moisture and ground in an electric mill Willey Model 4, to a fine powder.

Preparation of extracts

It was conducted using the methodology established by Pérez-Leal *et al.* (2005), to prepare the organic extracts flowers were macerated with three extraction solvents, acetone, dichloromethane and methanol of different polarity, for eight days at room temperature. The solutions were filtered through Wattman filter paper, in order to separate the extract from the remaining plant material. Crude extracts were obtained concentrating at reduced pressure in a rotary evaporator. To prepare the aqueous extracts, the flower was macerated for 24 h. Then the mother solution was prepared from the crude extract of the flower, of which were taken the concentrations to be used of 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5%.

Treatment preparation

For organic and aqueous extracts, six solutions of different concentrations were prepared at 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5% and for control pure solvent or distilled water was used depending on the case.

In vitro bioassays

The seeds used for this bioassay was previously tested and selected those that had 95% viability. The experiment was conducted at the Laboratory of Natural Products in the Agro-technological Faculty of Sciences from the Autonomous University of Chihuahua, according to the method described by Pérez-Leal *et al.* (2005). In petri dishes of 10 cm diameter a filter paper No.1 Wattman was placed, adding separately 2.5 ml of each concentration from the flower aqueous extracts, 50 seeds of each species were distributed, using distilled water as a control. Once prepared the plates and sealed with parafilm, were introduced into a germination chamber at 24 °C daylight time (16 h of light) and 20 °C

periodo nocturno (8 h oscuridad). Se probaron cada una de las concentraciones en dos especies de monocotiledóneas de *S. halepense*, *L. multiflorum* y tres especies de dicotiledóneas *L. vitrosa*, *A. donax* y *Medicago sativa*.

Para los extractos orgánicos a diferencia del extracto anterior, se adicionaron 1.5 ml de cada concentración dejándose evaporar completamente antes de depositar las semillas, finalmente, se agregaron 2.5 ml de agua destilada a cada caja y se colocaron las semillas correspondientes. El testigo se preparó de manera similar utilizando el disolvente puro correspondiente y posteriormente evaporándolo. Se mantuvieron hidratados los tratamientos con agua destilada y se tomaron lecturas cada 24 h. Las variables que se consideraron para evaluar la actividad alelopática: fueron germinación total (Gt; porcentaje de semillas germinadas) y velocidad de germinación acumulada (VGA) según Anjum y Bajwa (2005).

La última lectura se realizó tomando en cuenta el ciclo de germinación establecido para cada semilla, según se establece en las reglas internacionales para el ensayo de semillas (Anónimo, 1976).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una caja petri con 50 semillas y una comparación de medias de Tukey mediante el uso del software SAS versión 9.0 (2002).

Resultados y discusión

Extracto acuoso de flor

Cuando se evaluó la fitotoxicidad del extracto acuoso, en la inhibición de la germinación de las especies, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos respecto del control. Jhonson presentó una inhibición de 100% en la germinación a partir de la concentración mínima probada (Figura 2). Las semillas de lechuga y carrizo presentaron 60% mientras que Rayrass y alfalfa, tuvieron 20% de inhibición en la germinación. Estos resultados muestran que el extracto acuoso en las semillas de malezas Jhonson y Carrizo son más susceptibles a la actividad fitotóxica de *A. mollissimus*.

during night time (8 h dark). Each concentration was tested in two monocotyledon species of *S. halepense* and *L. multiflorum*, and three dicotyledonous species *L. vitrosa*, *A. donax* and *Medicago sativa*.

For the organic extracts unlike the previous extract, 1.5 ml of each concentration were added letting it to evaporate completely before placing the seeds, finally 2.5 ml of distilled water were added to each petri box and the corresponding seeds were placed. The control was prepared similarly using the appropriate pure solvent and subsequently evaporating it. Treatment with distilled water remained hydrated and readings were taken every 24 h. The variables that were considered to evaluate the allelopathic activity were: total germination (Gt; percentage of germinated seeds) and accumulated germination rate (VGA) according to Anjum and Bajwa (2005).

The last reading was performed taking into account the germination cycle established for each seed, as stipulated in international rules for seed testing (Anonymous, 1976).

Statistical analysis

The data was analyzed through an analysis of variance for a completely randomized design with four replicates per treatment, the experimental unit was a petri dish with 50 seeds and for Tukey test SAS software version 9.0 (2002) was used.

Results and discussion

Aqueous extract of flower

When phytotoxicity of aqueous extract was evaluated on the inhibition of germination of species, statistically significant differences between treatments regarding to control were found. Johnson presented a 100% inhibition of germination from the minimum concentration tested (Figure 1). Lettuce and reed seeds presented 60% while Rayrass and alfalfa, had 20% inhibition of germination. These results show that aqueous extract in Johnson and Reed weed seeds are more susceptible to the phytotoxic activity of *A. mollissimus*.

Corbino *et al.* (2002) studied the possible biological activity of leaf extracts of *Chenopodium album* on seed germination and seedling growth of lettuce, and found inhibition of the

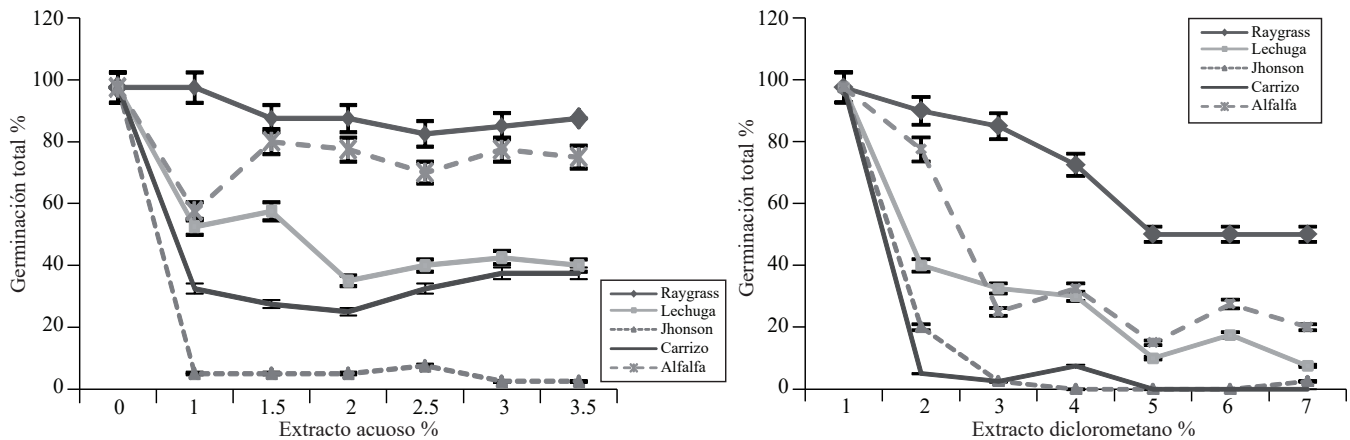


Figura 2. Efecto del extracto acuoso y diclorometano de *A. mollissimus* en la germinación total de las cinco especies probadas.
Figure 2. Effect of aqueous extract and dichloromethane of *A. mollissimus* in total germination of the five species tested.

Corbino *et al.* (2002) estudiaron la posible actividad biológica de extractos foliares de *Chenopodium album* sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de lechuga, y observaron inhibición del extracto acuoso, produciendo diferencias significativas respecto del control, en la longitud del hipocotilo. Asimismo, Puente *et al.* (2003) comprobaron el comportamiento alelopático del cultivo del girasol (*Helianthus annuus* L.) en la germinación y desarrollo de algunas malezas bajo condiciones de campo controladas. Utilizaron extractos acuosos de girasol al 50% (v/v) con 5 mL del extracto, mostrando una mayor inhibición en la germinación y en el retardo del crecimiento.

Extracto de diclorometano

Los resultados mostraron que la concentración y las diferentes especies probadas provocaron diferencias estadísticas significativas en relación al control (Figura 2), en Jhonson y Carrizo a partir de la concentración mínima probada tuvieron una efectividad 98% en la inhibición de la germinación, en lechuga se registró 70% de inhibición, sin embargo en Raygrass, a partir de la concentración de 2.5%, se obtuvo una inhibición de 50%. Al comparar el efecto fitotóxico sobre la germinación de los extractos diclorometano de flor en las cinco especies, resultó ser efectivo en la inhibición de la germinación de estas especies. Existen numerosas investigaciones con extractos de diversas especies al referirse a la fitotoxicidad y efecto alelopático (Blanco, 2006) *Helianthus annuus*, *Ipomea batata* L. (Blanco *et al.*, 2007) *Saccharum* spp. (Arévalo, 2011) entre otras. Por su parte Pérez-Leal *et al.* (2005) menciona que los extracto de diclorometano afecta quizás debido a la naturaleza de baja polaridad; su capacidad

aqueous extract, having significant differences compared to control in hypocotyl length. Also, Puente *et al.* (2003) proved the allelopathic behavior of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on germination and development of some weeds under controlled field conditions; using sunflower aqueous extracts at 50% (v/v) with 5 mL of extract, showing greater inhibition of germination and growth retardation.

Dichloromethane extract

The results showed that concentration and the different species tested caused statistically significant differences compared to control (Figure 2), in Johnson and Reed from the minimum concentration tested had 98% of effectiveness in inhibiting germination, in lettuce showed 70% inhibition; however in Raygrass from 2.5% concentration, an inhibition of 50% was obtained. When comparing the phytotoxic effect on germination of dichloromethane extracts of flower in five species, proved to be effective in inhibiting the germination of these species; many studies with extracts from various species when referring to phytotoxicity and allelopathic effect (Blanco, 2006) *Helianthus annuus*, *Ipomea batata* L. (Blanco *et al.*, 2007) *Saccharum* spp. (Arévalo, 2011) among others. Meanwhile Pérez-Leal *et al.* (2005) mentioned that dichloromethane extract has effect, perhaps due to the nature of low polarity; its ability to penetrate into the seed and tissue; dispersion and accumulation in intracellular compartments, and the solubility of its fraction in water.

Methanol extract

It showed statistically significant differences in Johnson and Reed seeds from the minimum concentration tested with 100% inhibition and Raygrass has the lowest with

para penetrar en la semilla y el tejido; la dispersión y la acumulación en los compartimentos intracelulares, y la diferente solubilidad de las fracciones en agua.

Extracto de metanol

Presentó diferencias estadísticamente significativas, en las semillas de Jhonson y Carrizo a partir de la mínima concentración probada, con el mayor porcentaje de inhibición de 100% y el más bajo lo presentó Raygras con un 40 % de inhibición de la germinación (Figura 3). Asimismo, Cabral *et al.* (2008) determinaron el potencial alelopático de neem (*Azadirachta*), sobre el crecimiento del sorgo, utilizando extractos de metanol, agua y hexano, en concentraciones de 10, 5 y 2 g de las flores de neem, obtenido un porcentaje de inhibición de 80% lo que es similar a los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que podemos decir que *A. mollisimus*, resultó fitotóxico en dos de las especies probadas, tomando en cuenta el alto porcentaje de inhibición obtenido.

Extracto acetona

Existieron diferencias significativas en todos los tratamientos probados. El mayor porcentaje de inhibición de la germinación, con 90% correspondió a Jhonson y Carrizo, mientras que Alfalfa Raygras y lechuga presentaron una inhibición de 65% a partir de la concentración mínima probada (Figura 3).

40% inhibition of germination (Figure 3). Also, Cabral *et al.* (2008) determined the allelopathic potential of neem (*Azadirachta*) on sorghum growth using methanol extracts, water and hexane, in concentrations of 10, 5 and 2 g of neem flowers, obtaining 80% inhibition which is similar to results obtained in this work, so it can be said that *A. mollisimus*, is phytotoxic in two of the species tested, considering the high percentage of inhibition obtained.

Acetone extract

There were significant differences in all treatments. The highest percentage of inhibition of germination with 90% corresponded to Johnson and Reed, whereas Alfalfa, Raygras and lettuce showed 65% inhibition from the minimum concentration tested (Figure 3).

These results show the phytotoxic effects of *A. mollisimus* extracts as potential inhibitors of seedlings growth, which is necessary to control weeds and other unwanted plants (Gámez *et al.*, 2002).

Also, it can be inferred that germination of Reed and Johnson seeds were the most affected by the four extracts, possibly because they are the most sensitive. Furthermore, although a low phytotoxicity of the aqueous extract compared with the organic was observed, the first has less

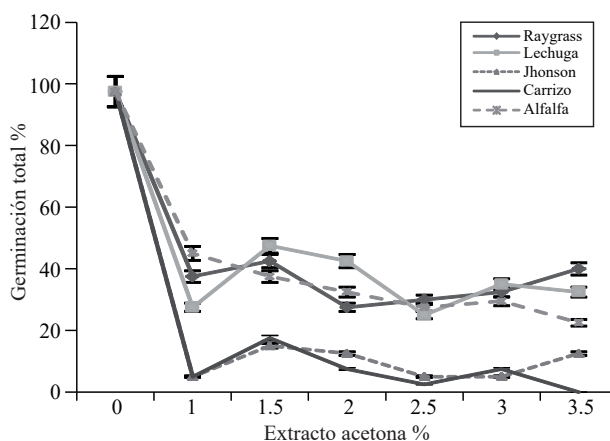
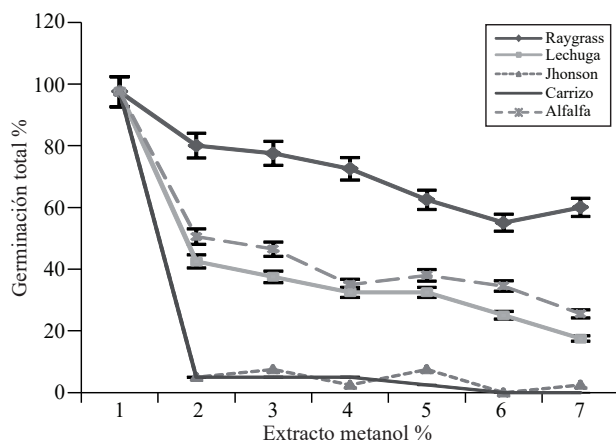


Figura 3. Efecto del extracto metanol y acetona de *A. mollisimus* en la germinación de las cinco especies probadas.
Figure 3. Effect of methanol and acetone extract of *A. mollisimus* on germination of five species tested.

Estos resultados han permitido evidenciar los efectos fitotóxicos de los extractos de *A. mollisimus* como potenciales inhibidores del crecimiento de plántulas, lo cual es necesario para el control de malezas y otras plantas no deseadas. (Gámez *et al.*, 2002).

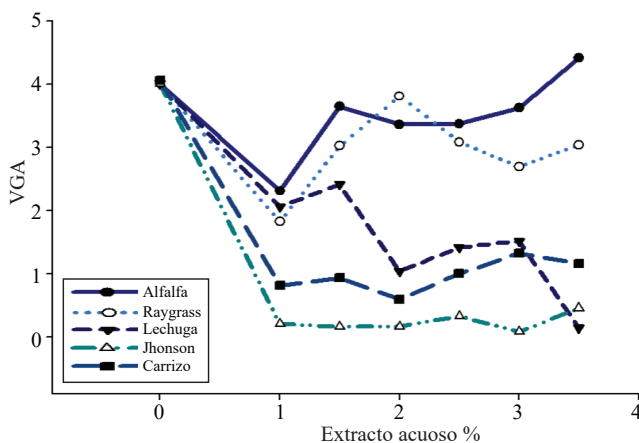
ecological implications, although the study of organic extracts allows identifying substances or metabolites in some cases with higher phytotoxic potential, and can serve as models for the synthesis of new natural herbicides (García-Mateos *et al.*, 2005). However, it is considered that inhibition

Asimismo, se puede inferir que la germinación de semillas de Carrizo y Jhonson fueron las más afectadas por los cuatro extractos, posiblemente porque son los más sensibles. Por otro lado, aunque se observó baja fitotoxicidad del extracto acuoso en comparación con los orgánicos, el primero tiene menos implicaciones ecológicas, aunque el estudio de los extractos orgánicos permite identificar sustancias o metabolitos en algunos casos con mayor potencial fitotóxico, y pueden servir de modelo para la síntesis de nuevos herbicidas naturales (García-Mateos *et al.*, 2005). Sin embargo, se considera que la inhibición de germinación detectada en este bioensayo hay que contrastarla en condiciones de campo, donde intervienen un mayor número de variables bióticas y abióticas (Chocarro y Lloveras, 2014).

Velocidad de germinación acumulada

Se calculó adicionalmente la velocidad de germinación acumulada (VGA) (Chiapusio *et al.*, 1997), observándose que en el extracto acuoso a partir de la mínima concentración probada, lechuga, Jhonson y Carrizo disminuyen su emergencia.

En el extracto diclorometanico de flor, Carrizo y Jhonson disminuyen su germinación a partir de la mínima concentración probada (Figura 4).



of germination detected in this bioassay has to be contrasted with field conditions, where a greater number of biotic and abiotic factors are involved (Chocarro and Lloveras, 2014).

Accumulated germination rate

Accumulated germination rate (VGA) was calculated (Chiapusio *et al.*, 1997), given that in the aqueous extract from the minimum concentration tested, lettuce, Johnson and Reed decrease their emergency.

The dichloromethane extract of flower, Reed and Johnson decrease their germination from the minimum concentration tested (Figure 4).

Figure 5, shows that germination rate decays from 1% concentration in Reed and Johnson with acetone extract of flower and 1.5% concentration in rest of the species decreasing its emergency rate and from there keeps on decreasing. In methanol all species decrease its emergency in the lower concentration of 1% (Figure 4). These results agree with those observed for Gt.

It can be seen that germination rate in most extracts had its largest decreases from the concentration of 1%, which leads us to conclude that is not necessary to apply a higher amounts, being Johnson and Reed the most affected in decreasing germination rate.

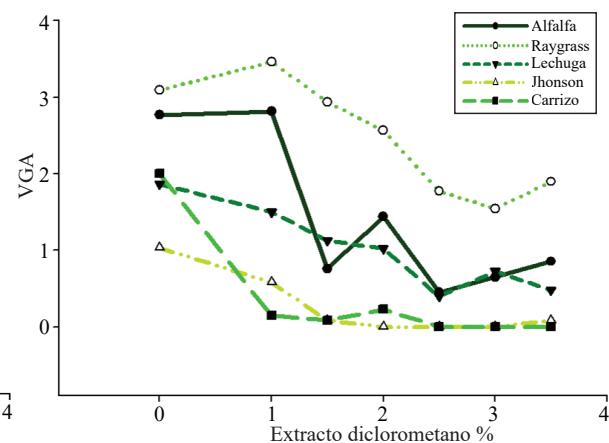


Figura 4. Velocidad de germinación acumulada del extracto acuoso y diclorometano de flor de *A. mollissimus* en las cinco especies probadas.

Figure 4. Accumulated Germination rate of the aqueous and dichloromethane flower extract of *A. mollissimus* in the five species tested.

En la Figura 5, observamos que la velocidad de germinación decae a partir de la concentración de 1% en Carrizo y Jhonson con el extracto acetona flor y la concentración de 1.5% hace efecto en las demás especies disminuyendo su velocidad de emergencia y de ahí continua su disminución.

Conclusions

It is conclude it that *Astragalus mollissimus* Torr. flower was effective in inhibiting germination in a range of 90% in the seeds of Johnson and Reed, with dichloromethane acetone

En metanol todas las especies disminuyen su emergencia en la concentración de 1%, (Figura 5). Estos resultados coinciden con los observados para Gt.

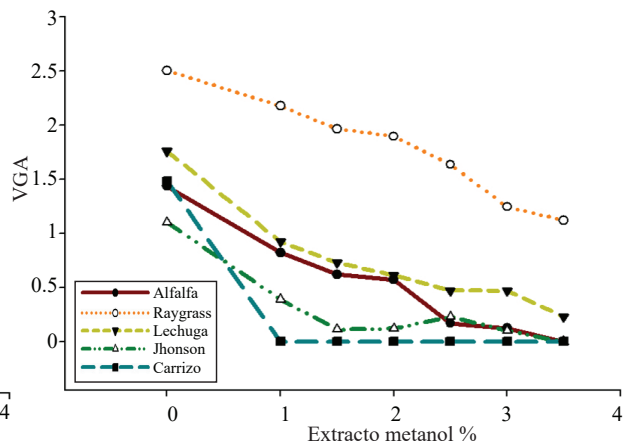
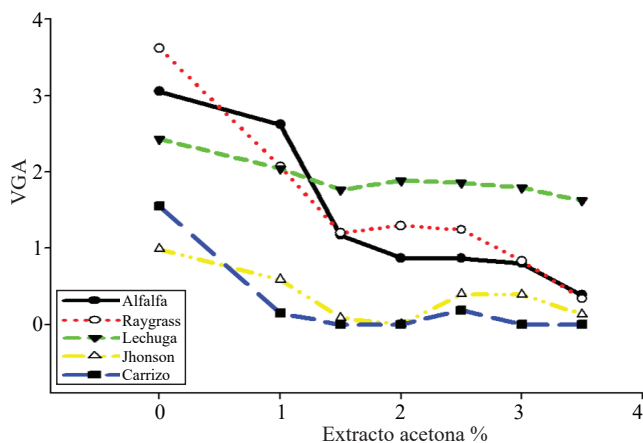


Figura 5. Velocidad de germinación acumulada del extracto acetona y metanol de flor de *A. mollissimus* en las cinco especies probadas.

Figure 5. Accumulated germination rate of acetone and methanol flower extract of *A. mollissimus* in the five species tested.

Por lo que podemos apreciar que la velocidad de germinación en la mayoría de los extractos tuvo su mayor disminución a partir de la concentración de 1%, lo que nos lleva a concluir que no es necesaria mayor aplicación de cantidad, siendo Jhonson y Carrizo los más afectados en la disminución de la velocidad de germinación.

Conclusiones

Se concluye que *Astragalus mollissimus* Torr., en su órgano flor fue efectivo en la inhibición de la germinación en un rango de 90% en las semillas de Jhonson y Carrizo, con los extractos de diclorometano acetona y metanol, el cálculo de la germinación acumulada determinó que a partir de la mínima concentración probada, se observa el efecto fitotóxico del extracto, por lo que resultaría conveniente proseguir con el estudio fitoquímico, con el fin de obtener los compuestos responsables de la actividad biológica.

Literatura citada

Anjum, T. y Bajwa, R. 2005. Importance of germination indices in interpretation of allelochemical effects. *International J. Agric. Biol.* 3:417-419.

and methanol extracts, calculating accumulated germination determined that from the minimum concentration tested, the phytotoxic effect of the extract is observed, and it

would be desirable to continue the phytochemical study, in order to obtain the compounds responsible for the biological activity.

End of the English version



- Anónimo. 1976. Reglas internacionales para ensayos de semillas. Ministerio de Agricultura, Dirección General de Producción Agraria, Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Madrid, España.
- Arévalo, R. A.; Bertonici, E. I.; Aranda, E. M. y González, T. A. 2011. Alelopatía en *Saccharum spp.* (caña de azúcar). *Avances de Investigación Agropecuaria.* 15(1):51-60.
- Ávila, L.; Murillo, W.; Durango, E.; Torres, F.; Quiñones, W. y Echeverri, F. 2007. Efectos alelopáticos diferenciales de extractos de eucalipto. *Scientia et Technica.* Colombia 1(33):203-204.
- Bensch, T. E.; Schalchli, S. H.; Fuentes, P. R.; Seemann, F. P. y Jobet, F. P. 2007. Potencial alelopático diferencial de cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) chileno sobre ballica anual (*Lolium rigidum*) var. Wimmera. *Idesia.* 25(2):81-89.
- Blanco, Y. 2006. La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos. *Cultivos tropicales* 27:5-16.
- Blanco, Y.; Hernández, I.; Urra, I. y Leyva A. 2007. Potencial alelopático de diferentes concentraciones de extractos de girasol (*Helianthus annuus*, L.) Maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) y boniato (*Ipomoea batata*, L.) sobre el crecimiento y desarrollo inicial del frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Cultivos Tropicales* 28:(3)5-9.
- Cabral, F. A.; Ferreira de S. I.; Costa dos S. C.; Queiroga de O. E. y Martinotto, C. 2008. Actividades alelopáticas de nim sobre el crecimiento de sorgo, lechuga y *Bidens pilosa* Ciências Agrotecnológicas Lavras. 32(5):1374-1379.

- Corbino, G.; Leicach, S.R.; Grass, M.Y. y Hodara, K. 2002. Efectos alelopáticos de los extractos foliares de *Chenopodium album* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de lechuga. *South African J. Plant Soil.* 14(4):165-168.
- Chiapusio, G.; Sánchez, A. M. and Reigosa, M. J. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *J. Chem. Ecol.* 23:2445-2453.
- Chocarro, C. y Lloveras, J. 2014. Potencial alelopático de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) sobre diferentes leguminosas forrajeras. *Pastos y Pac.* 53:153-160.
- Duke, S. O. F.; Dayan, A. M.; Rimando, K. K.; Schrader, G.; Aliotta, A. Oliva and Romagni, G. J. 2002. Chemicals from nature for seed management. *Weed Sci.* 50:138-151.
- García-Mateos, R.; Pérez-Leal, R.; Soto-Hernández, M. y Peña-Valdivia, C. 2005. Plantas con actividad alelopática: fuente de herbicidas naturales. León, Guanajuato. *In: II Encuentro, participación de la mujer en la ciencia.*
- Gámez-González, H.; Lozano del Río, D. E.; Zavala-García F.; Moreno-Limón, S.; Rangel, S. E.; Martínez-Lozano S. y Verde, S. J. 2002. Evaluación de extractos metanólicos y acuosos de *Sorghum halepense* y *Cynodon dactylon* sobre semillas de malezas. *In: VII Simposio de Ciencia y Tecnología: la investigación una herramienta esencial.* CONACYT.
- Gliessman, S. R. 2002. Agroecológica; procesos ecológicos de la agricultura. *Agronomía tropical de Investigación y enseñanza, Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza.* Costa Rica, CATIE. 222 p.
- Goyal, Sh. 2013. Ecological role of alkaloids. *In: natural products* (Ed.). Gopal, R. K. and Jean-Michel, M. Springer Berlin Heidelberg. 149-171 pp.
- Isaza, M. J. H.; Jiménez, G. F. J.; Galván, U. J. L. y Restrepo, J. C. 2007. Actividad alelopática de algunas especies de los géneros *Miconia*, *Tibouchina*, *Henriettella*, *Tococa*, *Aciotis* y *Bellucia* (Melastomataceae). *Scientia Et Technica.* 8(33):409-413.
- Knight, A. P. and Walter, R. G. 2003. Plants Affecting the Nervous. *In: a guide to plant poisoning of animals in North America.* (Eds.) Knight, A. P. and Walter, R. G. International Veterinary Information Service, Ithaca New York. 9-10 pp.
- Kogan, M. y Pérez, A. 2003. Herbicidas: fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Ediciones Universidad Católica de Chile. 323 p.
- Larrea-Alcázar, D. M. 2003. Alelopatía ¿Son las especies exóticas buenas predictoras de la respuesta de las especies nativas? *Ecología en Bolivia.* 38(1):61-64.
- Oliva, C. y Peña, D. 2004. Agricultura orgánica: ¿una alternativa para el desarrollo rural sostenible en la región de Coquimbo? Ediciones CEDEM. Santiago, Chile. 133 p.
- Panter, K. E.; James, L. F.; Gardner, D. R.; Ralphs, M. H.; Pfister, J. A.; Stegelmeier, B. L. and Lee, S. T. 2002. Reproductive losses to poisonous plants: influence of management strategies. *Agric. Res. Serv.* 53:301-308.
- Pazmiño, A. 1999. Alelopatía. Universidad de Chile escuela de agronomía fisiología vegetal. El rincón Universitario, Chile. 14 p.
- Pérez-Leal, R.; García-Mateos, M. R.; Vásquez-Rojas, T. R. y Colinas-León, M. T. 2005. Allelopathic potential of *Petiveria alliacea* L. *Agron. Sustain. Dev.* 25:177-182.
- Piñol, M.; Palazón, J. y Cusidó, R.. 2008. Introducción al metabolismo secundario. *In: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal.* 2ª. (Ed.). McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 323-348 pp.
- Pfister, J. A.; Stegelmeier, B. L.; Cheney, C. D. and Gardner, D. R. 2007. Effect of previous locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis* species) intoxication on conditioned taste aversions in horses and sheep. *J. An. Sci.* 85:1836-1841.
- Puente, I. M.; Torres, G. S.; Fajardo, G. C.; Rodríguez, G. M. y Corona, P. C. 2003. Efecto alelopático de extractos acuosos de girasol (*Helianthus annuus* L.) sobre la germinación y desarrollo de malezas bajo diferentes condiciones climáticas. *Centro Agrícola.* 1(30):31-36.
- Rabotnikof, C. M.; Petruzzi, H. J. and Stritzler, N. P. 2005. Implantación de pasturas de mijo perenne efecto del enmalezamiento con cebollín. *Boletín de Divulgación Técnica.* 88:05-07.
- Rizvi, S. J. H. and Rizvi, V. 1992. Allelopathy: basic and applied aspects. Champan and Hall, Boundary Row, London. 480 p.
- Rodríguez, G. H.; Mederos, M. D. y Echevarría, S. I. 2002. Efectos alelopáticos de diferentes especies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en condiciones de laboratorio. *Rev. Cub. Plantas Med.* 7(2):67-72.
- Rojas, G. M. y Gámez, G. H. 2002. Herbicidas de origen natural. *Ciencia UANL.* 5(2):160-164. Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2002. SAS user's guide. Statistics. Version 8. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. *J. Environ. Qual.* 19:749-756.
- Saucedo, T. R. 2008. Control químico de hierba loca. Campo experimental la campana. INIFAP SAGAR. Publicación especial Núm. 10, Chihuahua, Chihuahua. 6 p.
- Stegelmeier B. L.; Ralphs M. H.; Gardner D. R.; Molyneux R. J. and James, L. F. 1994. Serum α -mannosidase activity and the clinicopathologic alterations of locoweed (*Astragalus mollissimus*) intoxication in range cattle. *6:473-479.*
- Wink, M. and Latz, B. B. 1995. Allelopathic properties of alkaloids and other natural products: possible modes of action. *In: insights into allelopathy.* American Chemical Society, Symposium Series Núm. 582. American Chemical Society, USA. 117-126 pp.
- Wolfe, G. J. and Lance, E. R. 1984. Locoweed Poisoning in a Northern New Mexico Elk Herd. *J. Rane Mangem.* 37(1):59-63.
- Zamorano, C. y Fuentes, L. 2005. Potencial alelopático de *Brassica campestris* subsp. *Rapa* y *Lolium temulentum* sobre tres especies de malezas de la Sabana de Bogotá. *Agron. Colomb.* 23(2):261-268.