



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Máster en Ingeniería Agronómica**

Evaluación de aceites esenciales de cedro,  
abeto y pino como agentes de control  
biológico de malas hierbas.

Alumna: Sherezade Cuadrado San Miguel

Tutor: Fernando Manuel Alves Santos

Abril 2022

Copia para el tutor/a

<b>ÍNDICE DEL CONTENIDO</b> .....	<b>Pág.</b>
<b>I. RESÚMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
2.1. Control biológico.....	11
2.2. Aceites esenciales.....	13
2.2.1. Generalidades de los aceites esenciales .....	13
2.2.1.1. <i>Composición</i> .....	14
2.2.1.2. <i>Clasificación</i> .....	15
2.2.1.3. <i>Métodos de extracción</i> .....	15
2.2.2. Usos de los aceites esenciales .....	16
2.2.2.1. <i>Los aceites esenciales en la agricultura</i> .....	18
2.2.3. Aceite esencial de cedro.....	20
2.2.3.1. <i>Cedrus deodara</i> .....	20
2.2.3.2. <i>Generales de los aceites esenciales de cedro</i> .....	21
2.2.4. Aceite esencial de abeto.....	22
2.2.4.1. <i>Abies alba</i> .....	22
2.2.4.2. <i>Generales de los aceites esenciales de abeto</i> .....	22
2.2.5. Aceite esencial de pino .....	23
2.2.5.1. <i>Pinus sylvestris</i> .....	23
2.2.5.2. <i>Generales de los aceites esenciales de pino</i> .....	24
2.3. Malas hierbas .....	25
2.3.1. Generalidades de las malas hierbas .....	25
2.3.1.1. <i>Clasificación</i> .....	25
2.3.1.2. <i>Identificación</i> .....	26
2.3.1.3. <i>Métodos de control</i> .....	27
2.3.2. Especies vegetales empleadas en el estudio.....	27
2.3.2.1. <i>Linum usitatissimum</i> L. ....	27
2.3.2.2. <i>Lolium multiflorum</i> Lam. ....	28
2.3.2.3. <i>Lolium perenne</i> L. ....	29
2.3.2.4. <i>Rumex acetosella</i> L. ....	29
2.3.2.5. <i>Silene inflata</i> Sm. ....	30
2.3.2.6. <i>Sinapis arvensis</i> L. ....	31
2.3.2.7. <i>Nicotiana tabacum</i> L. ....	32

<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Material vegetal .....	35
4.2. Aceites esenciales.....	35
4.3. Ensayos de germinación de semillas en semilleros mediante riego.....	36
4.4. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros mediante un segundo tratamiento por riego .....	36
4.5. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros mediante pulverización ....	38
4.6. Ensayos de germinación en placas .....	39
4.7. Análisis estadístico .....	40
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
5.1. Ensayos de germinación de semillas en semilleros mediante riego.....	41
5.1.1. Germinación de semillas de <i>Linum usitatissimum</i> .....	41
5.1.2. Germinación de semillas de <i>Lolium multiflorum</i> .....	43
5.1.3. Germinación de semillas de <i>Silene inflata</i> .....	46
5.1.4. Germinaciones fallidas.....	51
5.1.4.1. <i>Especies no germinadas</i> .....	51
5.1.4.2. <i>Lolium perenne</i> .....	53
5.2. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros con un segundo tratamiento por riego.....	55
5.2.1. Supervivencia de plantas de <i>Linum usitatissimum</i> .....	55
5.2.2. Supervivencia de plantas de <i>Lolium multiflorum</i> .....	56
5.2.3. Supervivencia de plantas de <i>Silene inflata</i> .....	57
5.3. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros mediante pulverización ....	58
5.3.1. Supervivencia vegetal al aceite esencial de cedro .....	59
5.3.2. Supervivencia de <i>Nicotiana tabacum</i> al aceite esencial de cedro .....	60
5.4. Ensayos de nascencia y desarrollo radicular en placas.....	62
5.4.1. Germinación de semillas de <i>Linum usitatissimum</i> .....	62
5.4.2. Germinación de semillas de <i>Lolium multiflorum</i> .....	66
5.4.3. Germinación de semillas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	68
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>72</b>

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Material vegetal que contiene los aceites esenciales .....	14
Tabla 2: Especies vegetales empleadas en el ensayo y capacidad germinativa teórica .....	35
Tabla 3: Resultados análisis ANOVA para <i>Linum usitatissimum</i> .....	43
Tabla 4: Resultados análisis ANOVA para <i>Lolium multiflorum</i> .....	44
Tabla 5: Resultados análisis ANOVA para <i>Silene inflata</i> .....	47
Tabla 6: Resultados análisis ANOVA para <i>Lolium perenne</i> .....	54
Tabla 7: Porcentaje de superficie foliar superviviente de <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Silene inflata</i> y <i>Nicotiana tabacum</i> en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% .....	59
Tabla 8: Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para <i>Linum usitatissimum</i> .....	65
Tabla 9: Resultados de probabilidad de comparaciones por pares entre tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% y control con la U de Mann-Whitney para <i>Linum usitatissimum</i> en los diferentes días de observación .....	65
Tabla 10: Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para <i>Lolium multiflorum</i> .....	67
Tabla 11: Resultados de probabilidad de comparaciones por pares entre tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% y control con la U de Mann-Whitney para <i>Lolium multiflorum</i> en los diferentes días de observación .....	68
Tabla 12: Resultados de probabilidad de comparaciones por pares entre tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% y control con la U de Mann-Whitney para <i>Nicotiana tabacum</i> en los diferentes días de observación .....	70

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>Pág.</b>
Figura 1: Modo de liberación de aleloquímicos al medio.....	13
Figura 2: Órganos aéreos de <i>Cedrus deodara</i> (A), corteza (B) y piña (C).....	21
Figura 3: Órganos aéreos de <i>Abies sibirica</i> (A), corteza (B) y piñas (C).....	22
Figura 4: Órganos aéreos de <i>Pinus sylvestris</i> (A), corteza (B) y piñas (C).....	24
Figura 5: Órganos aéreos de <i>Linum usitatissimum</i> (A), hojas (B) y flor (C).....	28
Figura 6: Órganos aéreos de <i>Lolium multiflorum</i> (A), inserción de la hoja en el tallo (B) e inflorescencia (C).....	29
Figura 7: Órganos aéreos de <i>Lolium perenne</i> (A), inserción de la hoja en el tallo (B) e inflorescencia (C).....	30
Figura 8: Órganos aéreos de <i>Rumex acetosella</i> (A), tallo con restos de ócrea (B) y fructificación (C).....	30
Figura 9: Órganos aéreos de <i>Silene inflata</i> (A), detalle de la flor (B) e inflorescencias (C).....	31
Figura 10: Órganos aéreos de <i>Sinapis arvensis</i> (A), inflorescencias (B) y detalle del fruto (C).....	31
Figura 11: Órganos aéreos de <i>Nicotiana tabacum</i> (A) e inflorescencias (B).....	33
Figura 12: Semilleros con semillas de <i>Sinapis arvensis</i> (A), <i>Silene inflata</i> (B), <i>Lolium multiflorum</i> (C), <i>Linum usitatissimum</i> (D), <i>Rumex acetosella</i> (E) y <i>Sinapis arvensis</i> (F) con su correspondiente tratamiento con aceite esencial de cedro (columna izquierda), abeto (columna central) y pino (columna derecha) dosificados al 2,5%.....	37
Figura 13: Semillero con los controles de las especies utilizadas en el ensayo, de arriba abajo: <i>Lolium perenne</i> , <i>Rumex acetosella</i> , <i>Sinapis arvensis</i> , <i>Silene inflata</i> , <i>Lolium multiflorum</i> y <i>Linum usitatissimum</i> .....	38
Figura 14: Placas de Petri con semillas de <i>Linum usitatissimum</i> , <i>Lolium multiflorum</i> y <i>Nicotiana tabacum</i> y su correspondiente tratamiento.....	39
Figura 15: Evolución diaria de la germinación de <i>Linum usitatissimum</i> en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.....	41
Figura 16: Germinación de los controles de <i>Linum usitatissimum</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Silene inflata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Rumex acetosella</i> y <i>Sinapis arvensis</i> en el día 14 de tratamiento.....	42
Figura 17: Germinación de <i>Linum usitatissimum</i> y <i>Lolium multiflorum</i> en el día 52 de tratamiento por riego del aceite esencial de pino dosificado al 2,5%.....	42
Figura 18: Evolución diaria de la germinación de <i>Lolium multiflorum</i> en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.....	44
Figura 19: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Lolium multiflorum</i> en el día 18 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino.....	45
Figura 20: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Lolium multiflorum</i> el día 21 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino.....	45
Figura 21: Evolución diaria de la germinación de <i>Silene inflata</i> en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.....	47

Figura 22: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silene inflata</i> en el día 11 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino .....	48
Figura 23: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silene inflata</i> en el día 14 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino .....	49
Figura 24: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silene inflata</i> en el día 18 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino .....	49
Figura 25: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silene inflata</i> en el día 21 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino .....	50
Figura 26: Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silene inflata</i> en el día 52 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino .....	51
Figura 27: Evolución diaria de la germinación de <i>Rumex acetosella</i> en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% .....	52
Figura 28: Evolución diaria de la germinación de <i>Sinapis arvensis</i> en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% .....	53
Figura 29: Evolución diaria de la germinación de <i>Lolium perenne</i> en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% .....	54
Figura 30: Porcentaje de supervivencia de <i>Linum usitatissimum</i> con una dosis (color sólido) y con dos dosis (a rayas) de tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro y abeto.....	56
Figura 31: Porcentaje de supervivencia de <i>Lolium multiflorum</i> con una dosis (color sólido) y con dos dosis (a rayas) de tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro y abeto.....	57
Figura 32: Porcentaje de supervivencia de <i>Silene inflata</i> con una dosis (color sólido) y con dos dosis (a rayas) de tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro y abeto .....	58
Figura 33: Superficie foliar de <i>Lolium multiflorum</i> en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% (T) y control (C) .....	59
Figura 34: Superficie foliar de <i>Silene inflata</i> en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% (T) y control (C).....	60
Figura 35: Superficie foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% (T) y control (C) .....	60
Figura 36: Porcentaje foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> superviviente al tratamiento de aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% (C25), 1% (C10) y 0,5% (C05) .....	61
Figura 37: Evolución diaria de la germinación de <i>Linum usitatissimum</i> en placa de Petri frente a tratamientos con aceites esenciales al 0,05% de cedro (C05), abeto (A05) y pino (P05) y tratamientos al 0,5% y 2,5% .....	63
Figura 38: Germinación en placa de Petri de <i>Linum usitatissimum</i> en el día 13 de tratamiento con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% .....	64

---

Figura 39: Evolución diaria de la germinación de <i>Lolium multiflorum</i> en placa de Petri frente a tratamientos con aceites esenciales al 0,05% de cedro (C05), abeto (A05) y pino (P05) y tratamiento a 0,5% (T5) y 2,5% (T25) .....	66
Figura 40: Germinación en Placa de Petri de <i>Lolium multiflorum</i> en el día 13 de tratamiento con aceite esencial de pino dosificado al 2,5%.....	67
Figura 41: Evolución diaria de la germinación de <i>Nicotiana tabacum</i> en placa de Petri frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino (resultados iguales a todas las dosis) .....	69

## 1. RESUMEN

Las malas hierbas son el factor limitante que produce mayores pérdidas potenciales en la agricultura, alcanzando el 34% de pérdidas en producción y los 79.500 millones de euros anuales. La necesidad de combatir este enemigo natural junto a los efectos nocivos que producen los herbicidas químicos sobre la salud humana, animal y sobre el medio ambiente obliga al desarrollo de estrategias alternativas o complementarias al uso de herbicidas sintéticos tradicionales que permitan una agricultura capaz de producir alimentos de calidad mientras respeta el medio ambiente y el bienestar animal.

Por ello se investigan nuevos herbicidas basados en el potencial fitotóxico de algunos extractos de plantas que permiten el control de malas hierbas, como los aceites esenciales. Estos aceites son mezclas de componentes volátiles producidos por el metabolismo secundario de las plantas, cuyas propiedades se han aprovechado tradicionalmente en farmacología, cosmética, alimentación y como insecticidas, y, más recientemente, como bio herbicidas. Se han revisado los antecedentes y se han seleccionado nuevas combinaciones de aceites esenciales y especies vegetales no empleadas hasta el momento. En este estudio se evalúa la capacidad herbicida de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino, que no se han usado o muy escasamente como agentes de control biológico, sobre las especies arvenses de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Rumex acetosella*, *Silene inflata* y *Sinapis arvensis*, y el cultivo de *Nicotiana tabacum*, que habían presentado buena germinación en trabajos anteriores.

Se han llevado a cabo ensayos con los tres aceites esenciales aplicados *in vivo* mediante riego en semilleros dosificados al 2,5%, otro ensayo con una segunda aplicación de los aceites de cedro y abeto a la misma dosis, e *in vitro* mediante pipeteado en placas de Petri (dosis entre 0,05% y 2,5%), y se ha ensayado probando la fitotoxicidad del aceite esencial de cedro aplicado *in vivo* por pulverización sobre el follaje al 2,5%, 1% y 0,5%. Las pruebas realizadas sobre las semillas de *L. perenne*, *R. acetosella* y *S. arvensis* no han sido concluyentes porque las semillas conservadas en la colección presentaron problemas de escasa germinación.

El aceite esencial de cedro ha tenido efecto supresor sobre las especies de *L. usitatissimum*, *L. multiflorum*, *S. inflata* y *N. tabacum*. En el caso de *L. usitatissimum* ha tenido efecto sobre su germinación *in vitro* mediante pipeteado al 2,5% y al 0,5%. Para *L. multiflorum* ha tenido efecto *in vivo* mediante un riego y pulverización al 2,5% e *in vitro* mediante pipeteado en todas sus dosis. Para *S. inflata* ha sido controlado *in vivo* mediante uno y dos riegos y pulverización al 2,5%, y en el caso de *N. tabacum* ha controlado su germinación *in vivo* mediante pulverización e *in vitro* mediante pipeteado en todas las dosis ensayadas.

El aceite esencial de abeto ha tenido efecto supresor sobre las especies de *L. usitatissimum*, *S. inflata*, *L. multiflorum* y *N. tabacum*. En el caso de *L. usitatissimum* ha tenido efecto sobre su germinación *in vivo* mediante un riego e *in vitro* mediante pipeteado al 2,5% y al 0,5%. Para *S. inflata* ha sido fuente de control en su aplicación *in vivo* mediante un riego. En los casos de *L. multiflorum* y *N. tabacum* ha tenido efecto sobre su germinación *in vitro* mediante pipeteado al 2,5% y al 0,5%, y para *N. tabacum* también al 0,05%.

El aceite esencial de pino ha tenido efecto supresor sobre las especies de *L. usitatissimum*, *L. multiflorum* y *N. tabacum*. En el caso de *L. multiflorum* ha tenido efecto

sobre su germinación y desarrollo en su aplicación *in vivo* mediante un riego e *in vitro* mediante pipeteado a todas sus dosis. Para *L. usitatissimum* y *N. tabacum* ha tenido efecto sobre su germinación *in vitro* mediante pipeteado al 2,5% y al 0,5%, y para *N. tabacum* también al 0,05%.

Se puede concluir que los aceites ensayados tienen capacidad herbicida y por ello tienen un alto interés científico y un gran potencial, sin embargo, las altas dosis usadas hacen del procedimiento demasiado costoso por el momento.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas se enfrentan con diversos elementos que limitan su productividad: factores abióticos capaces de causar daños tanto por su exceso como por su defecto, como la irradiación solar, la disponibilidad de agua, las temperaturas ambientales o la presencia de nutrientes en el suelo; y factores bióticos, organismos perjudiciales que van a competir con los cultivos por los nutrientes, la luz y el agua disponibles, como las malas hierbas, las plagas animales y los patógenos. De estos factores limitantes, las malas hierbas son los que producen mayores pérdidas potenciales, del 34%, frente a las causadas por plagas y patógenos, del 18% y 16% respectivamente (Oerke, 2006). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2009) calculó monetariamente las pérdidas de producción ocasionadas por las malas hierbas, que alcanzan los 79.500 millones de euros (95.000 millones de dólares estadounidenses), posicionándolas como el enemigo natural número uno de la agricultura.

Tradicionalmente, la escarda mecánica junto con la aplicación de pesticidas químicos se ha posicionado como los métodos más eficaces para el control de malas hierbas, plagas y patógenos (Kaab *et al.*, 2020; Scavo *et al.*, 2020). Este método químico se encuentra bajo debate dados los efectos negativos derivados de su uso. Son bien conocidos los efectos nocivos que tienen los herbicidas químicos para la salud humana, provocando daños de corta duración como irritación de piel y ojos, dolor de cabeza, mareos o náuseas, hasta impactos crónicos como cáncer, asma o diabetes (Kim *et al.*, 2017), también tiene efectos sobre la salud animal y sobre otras plantas, impidiendo o limitando su nascencia, crecimiento y desarrollo (Igbedioh, 1991). A esto le sumamos el fuerte impacto negativo que ocasiona sobre el medio ambiente, donde su uso excesivo supone un riesgo para la biodiversidad y la estabilidad global (Mahmood *et al.*, 2016), el desarrollo de especies resistentes a herbicidas, que ya se observaba desde el inicio del desarrollo de herbicidas sintéticos en los años 1950-1960, y que en el año 2013 ya alcanzaban a 220 especies con resistencia a uno o más herbicidas y a 404 biotipos resistentes (Heap, 2014; Peterson *et al.*, 2018). Además, el uso de pesticidas también provoca la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, de los suelos y del aire (Aktar *et al.*, 2009). El conocimiento de estos efectos ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias alternativas o complementarias al uso de herbicidas sintéticos tradicionales, empleando de manera conjunta los métodos físicos, químicos y biológicos a través del Manejo Integrado de Plagas (Kim *et al.*, 2017) y los Sistemas de Manejo Integrado de Malas Hierbas, con el objetivo de proporcionar al cultivo una ventaja sobre las malas hierbas, manteniéndolas a niveles manejables y, al mismo tiempo, reduciendo el impacto de los plaguicidas (Ponce, 2006; Harker y O'Donovan, 2013).

Durante los últimos años, tanto productores como consumidores y gobernantes tienden hacia una agricultura sostenible y orgánica, con un enfoque más ecológico, donde la actividad agrícola garantice la producción de alimentos de calidad y asegure la protección del medio ambiente y el bienestar animal a lo largo de todas las etapas de la cadena de suministro (Campiglia *et al.*, 2007; Parlamento Europeo, 2018), para ello es necesario el desarrollo de estrategias de control alternativas.

El cambio de mentalidad del consumidor lo evidencia el Parlamento Europeo (2018) con la publicación de los datos sobre el incremento de las ventas de productos orgánicos de la Unión Europea entre los años 2012 y 2016, donde aumentaron un 47,7%, de los 20.800 millones de euros gastados en 2012 a los 30.700 millones de euros gastados en 2016 en productos orgánicos. Asimismo, publica los datos de suelo europeo dedicado

a la producción de cultivos orgánicos, que también es creciente en el mismo periodo, pero en este caso aumenta tan solo un 16,9%, pasando de las 10.047.896 ha en 2012 a las 11.931.589 ha en 2016. La notable diferencia entre la demanda de los productos ecológicos y su producción europea la cubren las crecientes importaciones. El suelo dedicado a cultivos orgánicos tan solo presenta el 7% del área orgánica total de la UE, situándose España como el principal país europeo en superficie, con un 16,9% del orgánico total europeo, seguido de Italia, Francia y Alemania, que juntos suponen el 54,4% del área orgánica total de la UE.

Para que estos anhelos se conviertan en una realidad es esencial que las explotaciones que producen de forma orgánica o ecológica sean viables económicamente, y con el fin de valorar esa viabilidad, Böcker *et al.* (2019) han realizado un estudio bioeconómico en el que se valoran los efectos de dos posibles situaciones sobre las explotaciones suizas productoras de trigo: la prohibición del uso de glifosato y la prohibición del uso de todos los herbicidas, llegando a la conclusión de que el éxito de una explotación con limitación en el uso de herbicidas, tanto en el caso de la prohibición del glifosato como de la prohibición de todos los herbicidas, es posible si cuenta con ayudas económicas justificadas por la conservación del suelo y la producción ecológica para compensar las pérdidas de producción ocasionadas por la competencia de las malas hierbas. El desarrollo de productos biológicos para el control de malas hierbas modificará estos resultados, disminuyendo las pérdidas de producción por competencia y variando los costes de manejo y aplicación de tratamientos, pero para poder estudiar los efectos económicos de los bio-herbicidas, debemos seguir investigando cuáles nos permiten controlar las malas hierbas en los diferentes cultivos y en las dosis adecuadas.

Para hacer frente a este desafío, muchos estudios se han centrado en la búsqueda de nuevos herbicidas seguros para el medio ambiente, como los llamados bio-herbicidas, basados en el potencial fitotóxico que poseen algunos extractos de plantas y componentes individuales, que permiten el control de malas hierbas en la producción de cultivos (Choi *et al.*, 2015). Las plantas aromáticas han sido objeto de diversos estudios, ya que se conocen como productores de gran cantidad de componentes bioactivos que hacen de los aceites esenciales unos potentes inhibidores de la germinación de semillas y retardantes del crecimiento de las plantas (Campiglia *et al.*, 2007; Frabboni *et al.*, 2019; Ibáñez y Blázquez, 2019a).

## 2.1. Control biológico

A lo largo de la historia de la agricultura, los avances tecnológicos desarrollados en torno al control de malas hierbas han sido enfocados en una reducción de labores (Hay, 1974). Hasta la década de 1930, las malas hierbas se controlaron de forma manual, mediante el uso de azadas y cultivadores de tiro. Los tractores de gasolina aparecieron en 1910, cuando solo eran capaces de arar y trillar, pero fue en los años 30 cuando supusieron un cambio en la agricultura estadounidense, dejando atrás las labores manuales al permitir el cultivo en hileras para eliminar las malas hierbas mientras el cultivo seguía su desarrollo. La difusión de la tecnología mecánica en España fue inicialmente escasa por razones sociales y, además, después se vió mermada por los efectos de la Guerra Civil, por lo que no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando comenzó a extenderse el uso de tractores en este país (Daniel, 2015).

Los avances científicos en materia de química producidos a lo largo de la Segunda Guerra Mundial dieron paso a una denominada “era química” en el desarrollo de herbicidas en la década de 1950 (Vats, 2014). Un herbicida es un químico que interrumpe la fisiología o metabolismo de una planta durante un tiempo suficiente para provocarla la muerte o reducir su crecimiento, y para ello existen diferentes mecanismos

de acción de herbicidas: inhibidores de la fotosíntesis, inhibidores de la síntesis de lípidos, inhibidores de la síntesis de aminoácidos, inhibidores de la síntesis de pigmentos fotosintéticos, inhibidores de la división celular, hormonales o inhibidores de la respiración, entre otros. Su aplicación en el suelo se realiza mediante pulverizadores suspendidos o arrastrados por el tractor, o por fumigación en bandas y, dependiendo de su formulación, esta aplicación se realizará antes y/o después de la emergencia del cultivo, denominándose herbicidas de pre y/o post-emergencia, respectivamente, y algunos herbicidas mantienen su persistencia en el suelo durante algunas semanas (Swinton y Van Deynze, 2017).

La evolución de las técnicas en química orgánica junto con las técnicas biológicas que se desarrollaron en la segunda mitad del siglo XX supuso un paso adelante en el estudio de los compuestos naturales, permitiendo tanto la identificación de los metabolitos secundarios de origen vegetal como su composición y los efectos que producen sobre otros sistemas biológicos. El metabolismo secundario de una planta se refiere a los productos obtenidos en el metabolismo vegetal que no son imprescindibles para su supervivencia, desarrollados a partir de una gran variedad de rutas metabólicas objeto de diversos papeles ecológicos fundamentales de las plantas, como su adaptación al entorno biótico y abiótico cambiante, su defensa frente a herbívoros, patógenos y otras plantas, la comunicación entre plantas, el olor de sus flores y las características organolépticas de sus frutos, entre otras (Álvarez-Iglesias *et al.*, 2012). La cantidad y calidad con la que la planta sintetiza estos metabolitos lo determinan su genotipo, sus nutrientes, las prácticas agrícolas desarrolladas y el tipo de suelo, agua, sol y viento a los que está expuesta la planta productora (Angulo, 2014). Actualmente se llevan a cabo diversos estudios fitoquímicos con los que se pretende comprender el papel ecológico de los metabolitos secundarios de las plantas, y se han obtenido resultados aplicables tanto en el desarrollo de fármacos, productos alimentarios y cosméticos, como en el tema que nos atañe: el desarrollo de pesticidas respetuosos con el medio ambiente, en particular los herbicidas de origen biológico.

Algunos de los metabolitos secundarios producidos por las plantas participan en interacciones alelopáticas, es decir, son capaces de inhibir químicamente a otras especies. Las alelopatías ocurren de forma natural constantemente en el medio, y para las interacciones producidas en laboratorios de forma no natural se utiliza el término fitotoxicidad, estudios que se realizan con extractos de plantas o compuestos aislados con el fin de conocer de forma más específica los efectos directos producidos (Soltys *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2004).

Podemos encontrar metabolismos productores de alguna molécula con efecto alelopático en la mayoría de las plantas, moléculas presentes en cualquier parte de estas: sus semillas, raíces, tallos, hojas, inflorescencias, flores o frutos, y estas moléculas pueden ser o no liberadas al medio. Tal como se muestra en la Figura 1, algunas plantas liberan al medio estos metabolitos secundarios en forma de exudados radiculares (catequinas o sorgoleona), otras los acumulan en su parte aérea (ácido p-hidroxibenzoico, o ácido p-cumárico), y pueden ser liberados a la atmósfera como volátiles (jasmonato de metilo o alfa-pineno), o liberados en el suelo tras su caída y descomposición o lixiviación (quercetina, DIMBOA o juglona). La forma en la que son liberados va a influir en su método de extracción, como la extracción mediante solventes orgánicos con aplicación de calor, agitación o ultrasonidos (Álvarez-Iglesias *et al.*, 2012). Una vez aislado e identificado, este material biológico podrá ser utilizado en bioensayos para evaluar la actividad relativa de la sustancia obtenida y compararla con otra sustancia estándar de actividad conocida (Webster, 1980).

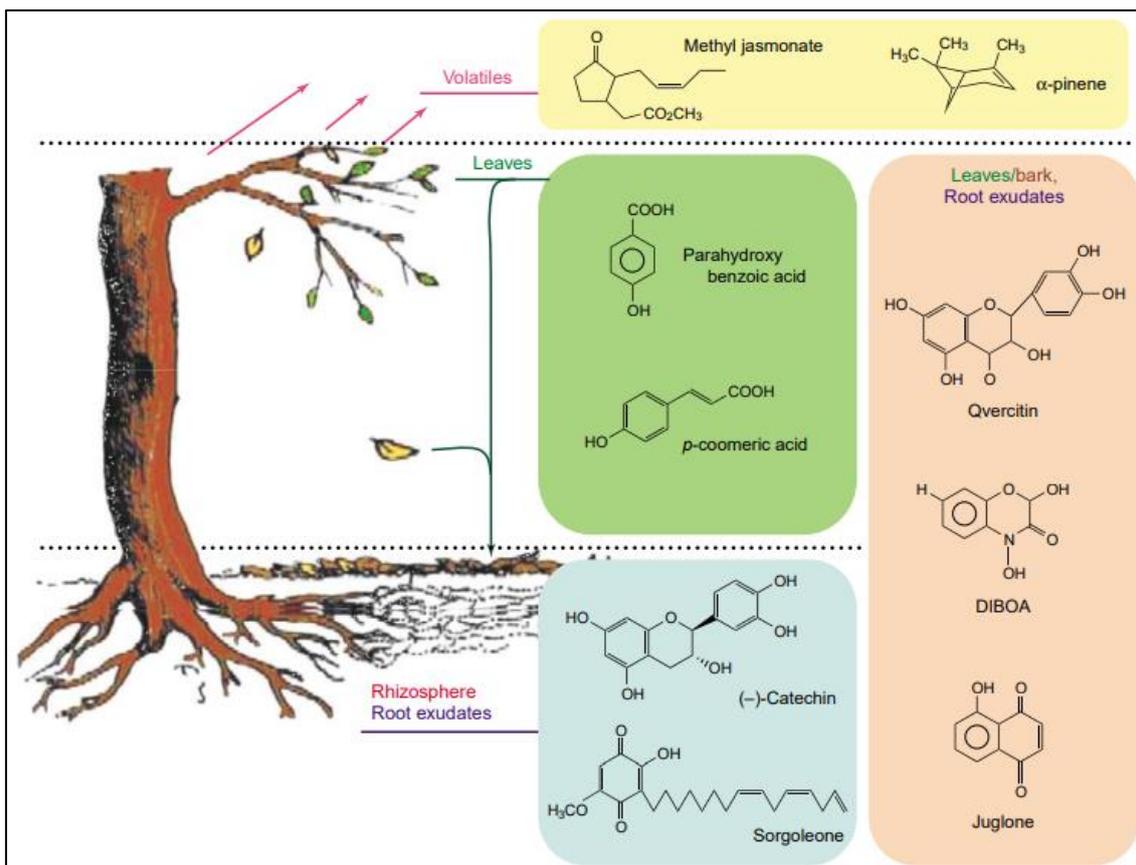


Figura 1: Modo de liberación de aleloquímicos al medio. (Weir *et al.*, 2004)

Entre los aleloquímicos liberados al medio como volátiles encontramos el metiljasmonato, con propiedades estimulantes del crecimiento, o el alfa-pineno, con propiedades analgésicas, nombrados en la anterior figura, y, también encontramos los aceites esenciales, algunos de ellos con potencial fitotóxico, que permiten su uso como bio-herbicidas.

## 2.2. Aceites esenciales

### 2.2.1. Generalidades de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de componentes volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas. Son compuestos no grasos, volátiles, ligeros e intensamente aromáticos. En cuanto a sus propiedades físicas, se caracterizan por su aspecto oleaginoso, generalmente de densidad menor a la del agua, su viscosidad, su actividad óptica y su índice de refracción, que será característico para cada aceite esencial y se modifica al ser diluido o mezclado con otras sustancias (Martínez, 1996; Ortuño, 2006).

No todas las plantas contienen aceites esenciales y, además, no todas las que los contienen lo hacen con una concentración suficiente para ser aprovechables. Alrededor de 60 familias botánicas son conocidas como productoras de aceites esenciales, aunque unas familias son más ricas en plantas productoras que otras, como son las familias: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Liliaceae*, *Magnoliaceae*, *Cupressaceae*,

*Pinaceae, Hypericaceae, Fabaceae, Malvaceae, Myrtaceae y Oleraceae* (Frabboni *et al.*, 2019).

Los aceites esenciales se pueden obtener de diversas partes de las plantas, como sus hojas, raíces, tallo, frutos, semillas, rizomas, flores o brotes, entre otros, almacenándose en estructuras específicas dentro de las plantas, dependiendo de la familia o especie encontraremos unos u otros tipos de estructuras de almacenamiento. Cada tipo de célula de almacenamiento de las plantas producirá diferentes tipos de aceites esenciales, por ello, aunque sean obtenidos de la misma planta, su composición química puede variar dependiendo de la parte de la planta de la que se extraen (International Federation of Aromatherapists, 2021). Entre las posibles estructuras secretoras de aceites esenciales se encuentran células, cavidades, ductos y glándulas secretoras, tricomas glandulares y células epidérmicas.

Cada planta es capaz de producir aceites esenciales en diferentes partes de su fisiología, tal como se muestra en la Tabla 1, donde también observamos algunas plantas capaces de generar distintos aceites esenciales en diferentes partes, como el pino en sus acículas y su madera, la nuez moscada en sus semillas y sus frutas o el pachuli en hojas y flores.

**Tabla 1:** Material vegetal que contiene los aceites esenciales. (Tongnuanchan y Benjakul, 2014)

<b>Material vegetal</b>	<b>Planta productora de aceites esenciales</b>
Hojas	Albahaca, laurel, canela, salvia, eucalipto, hierba limón, citronela, melaleuca, menta, orégano, pachuli, pino, romero, hierbabuena, árbol de té, tomillo, lima, ajedrea, estragón, mirto de limón, árbol de té de limón, <i>Lantana</i> .
Semillas	Almendra, anís, cardamomo, alcaravea, apio, cilantro, comino, nuez moscada, perejil, hinojo.
Corteza	<i>Amyris</i> , cedro del Atlas, cedro del Himalaya, alcanfor, palo rosa, sándalo, mirto, guayaco.
Bayas	Pimienta de Jamaica, enebro.
Resina	Incienso, mirra.
Flores	Tanaceto azul, manzanilla, salvia, clavo, comino, geranio, jazmín, lavanda, mejorana, naranja, rosa, bacarías, palmarosa, pachuli.
Piel del fruto	Bergamota, pomelo, lima, limón, naranja, mandarina.
Raíz	Jengibre, cúrcuma, valeriana, nardo, angélica.
Frutos	Nuez moscada, pimienta negra.

### 2.2.1.1. Composición

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos naturales volátiles, tales como terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), compuestos aromáticos (aldehídos, alcoholes, fenoles...) y terpenoides (isoprenoides) (Tongnuanchan y Benjakul, 2014). La composición de estos aceites esenciales se ve afectada por aspectos fisiológicos como el estado de desarrollo de los órganos vegetales, ciclo de actividad de los polinizadores, tipo de material vegetal, tipo de estructura secretora, variación estacional y daños químicos o mecánicos sufridos por la planta; condiciones ambientales como el

clima, contaminación, enfermedades y plagas, factores edáficos; variaciones geográficas, factores genéticos y evolución y condiciones de almacenamiento (Figueiredo *et al.*, 2008).

### 2.2.1.2. Clasificación

Martínez (1996), realiza la clasificación de los aceites esenciales siguiendo diferentes criterios, como son su consistencia, su origen y la naturaleza química de sus componentes mayoritarios.

Atendiendo a la naturaleza de los aceites esenciales, estos se clasifican como:

- Esencias fluidas: líquidos muy volátiles a temperatura ambiente, entre los que encontramos esencias de albahaca, caléndula, citronela, romero, tomillo, menta, salvia o limón.
- Bálsamos: compuestos de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, como el bálsamo de copaiba, bálsamo del Perú, Benjuí o bálsamo de Tolú.
- Oleorresinas: líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas que poseen el aroma de las plantas en forma muy concentrada, entre ellos se encuentran el caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra o la pimienta de clavel.

De acuerdo con su origen, los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales: obtenidos directamente de la planta, no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, son costosos y de composición variada.
- Artificiales: obtenidos mediante el enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, entre ellos encontramos mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con antol.
- Sintéticos: obtenidos por la combinación de sus componentes, que frecuentemente son producidos por procesos de síntesis química. Son los más económicos y muy utilizados como aromatizantes y saborizantes, como las esencias de vainilla, limón o fresa.

Para poder clasificar los aceites esenciales desde el punto de vista químico debemos centrarnos en sus componentes mayoritarios dada su compleja composición a base de diferentes tipos de sustancias. En base a esto podemos hacer una clasificación general donde encontramos:

- Aceites esenciales monoterpenoides: aquellos ricos en monoterpenos, entre los que se encuentran la hierbabuena, albahaca o salvia.
- Aceites esenciales sesquiterpenoides: aquellos ricos en sesquiterpenos, como la copaiba, pino o junípero.
- Aceites esenciales fenilpropanoides: aquellos ricos en fenilpropanos, entre ellos encontramos el clavo, canela o anís.

### 2.2.1.3. Métodos de extracción

A la hora de elegir el método de extracción del aceite esencial adecuado se debe tener en cuenta la variedad del material vegetal, la parte de la planta empleada y la estabilidad del aceite que se desea obtener para así poder conseguir la calidad deseada del

producto final. La extracción podrá realizarse mediante métodos directos, destilación o extracción con solventes (Angulo, 2014).

Los métodos directos se utilizan principalmente sobre los cítricos, ya que sus aceites se encuentran en la corteza de la fruta y el calor de las destilaciones podría alterar su composición. Como métodos directos principales se encuentran la extrusión o raspado para la obtención de aceites esenciales de cítricos, y la exudación para la obtención de gomas, resinas y bálsamos de árboles y arbustos.

La destilación permite separar las sustancias volátiles por calentamiento, ya que la vaporización del aceite ocurre a menor temperatura que la del punto de ebullición del agua, después se va a enfriar este vapor para condensarlo y reducirlo de nuevo a líquido. Mediante este método se obtienen aceites esenciales y aguas aromáticas, distinguiéndose diferentes procedimientos como la destilación por arrastre con vapor de agua, la hidrodestilación, la destilación agua-vapor o agua-vapor húmedo, la destilación previa maceración, la destilación al vacío y la destilación molecular.

Las características de la extracción con solventes van a depender del tipo de solvente utilizado, distinguiéndose los siguientes tipos de extracción:

- Extracción con solventes volátiles: se emplean disolventes orgánicos que permiten trabajar a bajas temperaturas evitando la destrucción y alteración química de los componentes del aceite. Se utiliza a escala de laboratorio obteniendo infusiones y resinoides alcohólicos, concretos y absolutos.
- Extracción con solventes fijos: se utilizan grasas y aceites calientes, donde se sumergen los pétalos de flores para después extraer las esencias con alcohol, obteniendo así absolutos de pomadas y de enflorados.
- Extracción con fluidos en estado supercrítico: se utilizan sustancias químicas, como el dióxido de carbono, en condiciones especiales de temperatura y presión sobre el material vegetal. Este método se ha utilizado como innovación en la obtención de especias naturales ya que mejora la relación calidad/precio de los alimentos.
- Enfloración o enfleurage: se emplea para la extracción de esencias de flores delicadas, sensibles al calor y costosas como las rosas, jazmín, azahar, acacia, violeta y algunas resinas como la mirra mediante el contacto de los pétalos frescos con grasa y un posterior tratamiento con alcohol y destilado.

### 2.2.2. Usos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales llevan empleándose desde hace más de 3.500 años, en sus inicios se utilizaban como elementos curativos, cicatrizantes e incluso protectores de malos espíritus asociados a rituales religiosos. Gracias a sus propiedades analgésicas, calmantes, antiinflamatorias, estimulantes, regeneradoras, cicatrizantes, tonificantes y bactericidas se han usado de forma tradicional en el desarrollo de productos farmacéuticos, perfumes y cosméticos, insecticidas o como condimento alimenticio (Dufort, 2017).

La aplicación de las plantas y sus beneficios en farmacología no es nueva, antes del uso de los medicamentos ya se aprovechaba la actividad terapéutica de las plantas, aunque las últimas tendencias sociales más concienciadas con la crisis climática apuestan de nuevo por los ingredientes naturales, dando fuerte importancia a la aromaterapia y el uso de aceites esenciales, aplicable en patologías víricas, dolores musculares y articulares, alergias, varices, problemas circulatorios, picaduras de insectos, malas digestiones, irritaciones... ("La guía de tres farmacéuticas para usar

(bien) los aceites esenciales”, 2019). La búsqueda de nuevas aplicaciones de aceites esenciales ya conocidos es continua, como la actividad antibacteriana y antiinflamatoria de diversos aceites esenciales como el orégano, el tomillo, la canela, el clavo o la naranja dulce, que se ha estudiado *in vitro* frente a microorganismos como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis* para el desarrollo de productos contra el acné como geles, lociones o colutorios (Torrenegra *et al.*, 2015; Matiz *et al.*, 2015; Juárez *et al.*, 2010). También se estudia el potencial citotóxico de aceites esenciales de plantas como el cordoncillo (*Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum*) para el desarrollo de productos farmacéuticos (Rivera, 2008).

En cosmética natural, los aceites esenciales se presentan como aliados que prometen conseguir tratamientos más asequibles económicamente y más respetuosos con la piel gracias a su aporte de ácidos grasos y vitaminas A, E, D y B, que permiten retrasar los efectos del envejecimiento y reducir la aparición de manchas, arrugas, acné, sequedad o celulitis, entre otros. Emulsiones con fines antibacterianos, humectantes o conservantes a partir de aceites esenciales de plantas como orégano, tomillo o limón se estudian para el desarrollo de nuevos cosméticos que puedan unirse a otros compuestos ampliamente conocidos por sus aplicaciones en cosmética, como el aceite de argán, el aceite de árbol del té, aceite de coco, aceite de semillas de uva o aceite de rosa mosqueta (Medina y Bautista, 2015; Cabrera, 2020; Fernández, 2020).

El uso de productos químicos sintéticos para el control de insectos es cuestionado por sus efectos con el medio ambiente y la salud humana. Los aceites esenciales pueden ser la solución como una alternativa natural y más respetuosa con el medio ambiente al uso de insecticidas. Plantas del género *Cymbopogon* como la citronela, la palma-rosa o el “lemon-grass” se han usado tradicionalmente para repeler mosquitos en regiones de la Amazonia boliviana, y otras familias de plantas como melaleuca o *Eucalyptus* poseen plantas con aceites esenciales prometedores como repelentes (Saiz, 2018). También se han estudiado otros aceites esenciales con capacidades insecticidas contra larvas y adultos de diferentes especies de mosquitos, como los aceites esenciales de cúrcuma, cajeput (melaleuca) y artemisa, cuya acción insecticida ha sido verificada sobre larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Leyva *et al.*, 2008), o los aceites de citronela, eucalipto y clavo, ensayados sobre hembras adultas de las especies de insectos *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, obteniéndose resultados positivos y mayores mortalidades de los insectos con el aceite esencial de citronela (Castro *et al.*, 2013).

El uso alimentario de los aceites esenciales se da en condimentos potenciadores de olores y sabores en los alimentos, empleando algunos como la canela, el cardamomo, el jengibre, el neroli o el orégano, o potenciadores en infusiones, con el boldo, el cedro, la salvia amarga, la menta poleo o el romero, que pueden tomarse en infusión pero son tóxicos si se emplean directamente sobre los alimentos (“Aceites esenciales como conservantes y potenciadores productivos”, 2019), o su aplicación a los alimentos como antioxidantes, que permiten inhibir la oxidación de lípidos y otros compuestos como vitaminas. Otros aceites se emplean en el desarrollo de envases activo para la conservación de productos alimenticios, aprovechando sus propiedades antimicrobianas, como en el caso del romero, y antioxidantes, como el clavo, el tomillo o la citronela, para conservar productos cárnicos y pesqueros (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

También se investiga su uso en nutrición animal, como el aceite esencial de canela empleado para la mejora de las producciones gracias a sus propiedades mejorantes de la palatabilidad y digestibilidad, la regulación de la flora intestinal y sus efectos

antioxidantes enzimáticos (“Aceites esenciales como conservantes y potenciadores productivos”, 2019).

Otras aplicaciones son más recientes, como el estudio del efecto fitotóxico de los aceites esenciales de algunas plantas, que, aunque ya lo observó tiempo atrás Muller (1986) al comprobar la ausencia de plantas anuales en los alrededores de arbustos aromáticos, su importancia ha crecido en los últimos años con el interés del desarrollo de herbicidas de origen natural. Así mismo ocurre con su utilización como biopesticidas o insecticidas naturales en la agricultura.

### 2.2.2.1. Los aceites esenciales en la agricultura

#### Aceites esenciales como fungicidas de origen natural

Los hongos fitopatógenos son los microorganismos patológicos que más enfermedades pre y postcosecha causan en la agricultura, afectando principalmente a cereales, leguminosas, hortalizas y frutas, ocasionando daños económicos y poniendo en riesgo la disponibilidad de alimentos y la seguridad alimentaria (Arribas, 2018). Los hongos causantes del deterioro y la producción de productos frescos y almacenados más comunes pertenecen a las especies *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phomopsis* y *Rhizopus*, y los fungicidas sintéticos son, hasta la fecha, los mejores aliados en contra de estos enemigos, pero dados los problemas medioambientales y de salud pública que producen se han investigado métodos biológicos para su control.

Arribas (2018), ha evaluado los aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo como posibles agentes de biocontrol de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Penicillium*, obteniendo resultados positivos para el control *in vitro*, principalmente para control de *Penicillium*, al contrario que con *Fusarium*, donde ninguno de los aceites proporcionó un control aceptable. La podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) también se ha tratado de controlar con aceite esencial de jengibre, donde Flores (2017), determinó que la formulación con la mejor actividad antifúngica fue la dosis del 4% de aceite esencial.

Los aceites esenciales de eucalipto y cáscara de naranja se han probado en laboratorio como fungicidas contra *Absidia* spp. y *Fusarium oxysporum* (Alzate *et al.*, 2009), obteniéndose resultados positivos con el eucalipto frente a los tres hongos y, con menor efectividad, la naranja, controlando tan solo el hongo *Trichoderma harzianum*. También se ha investigado la posibilidad de controlar el hongo *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en nuez moscada con los aceites esenciales de canela y orégano, donde ambos pudieron controlar el hongo, aunque en la producción de aflatoxinas se observó mayor inhibición mediante el aceite de canela que con el de orégano (García-Camarillo *et al.*, 2006). Actualmente existen productos de aceite de clavo registrados como fungicidas de control sobre el hongo *Gloeosporium* spp. en manzanas, membrillos y peras (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

#### Aceites esenciales como herbicidas de origen natural

Diversas plantas productoras de aceites esenciales ya conocidas por sus aprovechamientos naturales se han vuelto a estudiar buscando posibles efectos fitotóxicos para así sustituir o, al menos, reducir el uso de herbicidas sintéticos. Algunos aceites son capaces de inhibir la germinación de las semillas de malas hierbas, como en el caso del aceite esencial de lavanda, donde se ha comprobado su capacidad de reducción de la germinación de malas hierbas como *Amarantus retroflexus* L., *Sinapis arvensis* L. o *Lolium* spp. (Campiglia *et al.*, 2007). El aceite esencial de eucalipto

también causa la disminución de la germinación de malas hierbas, pero además, aplicándolo sobre plantas adultas ocasiona lesiones en el follaje de estas (Batish *et al.*, 2008), y es capaz de inhibir el brote de la patata (Gómez-Castillo *et al.*, 2013), para este uso encontramos registrado un producto de aceite esencial de menta, capaz de evitar la brotación en patatas de consumo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021); otro ejemplo de fitotoxicidad lo encontramos en el aceite esencial del orégano, causante de la reducción de la germinación de semillas e inhibidor del crecimiento de *Matricaria chamomilla* L. (Frabboni *et al.*, 2019).

En este estudio se evalúan las capacidades de los aceites esenciales de cedro, pino y abeto como agentes de control biológico de diferentes especies de malas hierbas, se han elegido estos aceites tras revisar su bibliografía, donde podemos ver que existen indicios de su capacidad fitotóxica.

El aceite esencial de pino (*Pinus sylvestris* L.) ha sido estudiado y desarrollado comercialmente como un bio-herbicida de éxito en la agricultura ecológica, producido a una concentración del 10% de esencia de pino proporciona un control eficiente sobre *Polygonum persicaria* L., *Solanum nigrum* L., *Amaranthus* spp., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Silene gallica* L., *Spergula arvensis* L., *Veronica* spp., *Coronopus didymus* (L.) Sm., *Cerastium Glomeratum* Thuill., *Rumex* spp., *Anagallis arvensis* L. y *Taraxacum* spp. (James *et al.*, 2002). Young (2004) también ha investigado la capacidad fitotóxica del aceite comercial de pino sobre el follaje de plantas, obteniendo resultados positivos en las especies de *Hordeum murinum* L., *Taeniatherum caput-medusae* (L.) Neviski, *Avena barbata* Pott. ex Link., *Vicia sativa* L., *Erodium botrys* (Cav.) Bertol., *Centaurea solstitialis* L., *Bromus hordeaceus* L. y *Plantago major* L. En cambio, sobre las especies de *Portulaca oleracea*, *Lolium multiflorum*, y *Echinochloa crus-galli* no se han encontrado efectos significativos de fitotoxicidad producida por este aceite (Ibáñez y Blázquez, 2019b).

Otras especies pertenecientes a la familia *Pinaceae* también han sido estudiadas como fuente de aceites esenciales con posible potencial fitotóxico, dentro del género *Pinus* encontramos los estudios de Amri *et al.* (2012, 2013, 2017), que han investigado el control que ejercen los aceites esenciales de *Pinus pinea* Linn., *Pinus halepensis* Miller. y *Pinus nigra* L. en la germinación y vigor de las semillas y crecimiento de las plántulas, comprobándose el control de los aceites esenciales de diferentes órganos de *Pinus pinea* Linn. y *Pinus halepensis* Miller. a ciertas dosis sobre las especies de *Sinapis arvensis* L., *Lolium rigidum* Gaud. y *Raphanus raphanistrum* L., y los aceites esenciales de las acículas y los conos masculinos de *Pinus nigra* L. ocasionan fitotoxicidad sobre las especies de *Phalaris canariensis* L., *Trifolium campestre* Shreb. y *Sinapis arvensis* L.

### Aceites esenciales como insecticidas de origen natural

Los insectos fitófagos suponen menos del 3% de la diversidad de los insectos, y en ecosistemas naturales se encuentran en equilibrio mediante enemigos naturales que mantienen sus poblaciones reguladas. En los sistemas agrícolas este equilibrio se altera, lo que hace que algunas especies aumenten excesivamente su población manifestándose como plagas, causando pérdidas en los cultivos, gastos excesivos en las medidas de control y residuos de insecticidas en las cosechas que pueden tener efectos nocivos sobre la salud de los consumidores (Vázquez, 2012).

Se ha comentado ya la posibilidad de utilizar algunos aceites esenciales como repelentes de insectos de forma doméstica, también existen aceites esenciales responsables de la mortalidad de insectos, permitiendo el control de diferentes plagas

de forma natural y específica. Se ha comprobado la toxicidad de diferentes aceites esenciales sobre pulgones, causantes de daños directos en las plantas por su alimentación y de daños indirectos como vectores de importantes virosis (Cantó-Tejero *et al.*, 2017), los aceites de comino, anís, orégano y eucalipto han demostrado su toxicidad sobre el pulgón del algodón (Isman, 2000) o el efecto repelente de aceites esenciales de salvia, lavanda y tomillo sobre el pulgón de la avena (Santana *et al.*, 2012). Actualmente existen productos con aceite esencial de naranja registrados como insecticidas contra trips, escarabajo, mosca blanca o ácaros y productos de aceite esencial de colza registrados contra ácaros, pulgones y cochinillas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

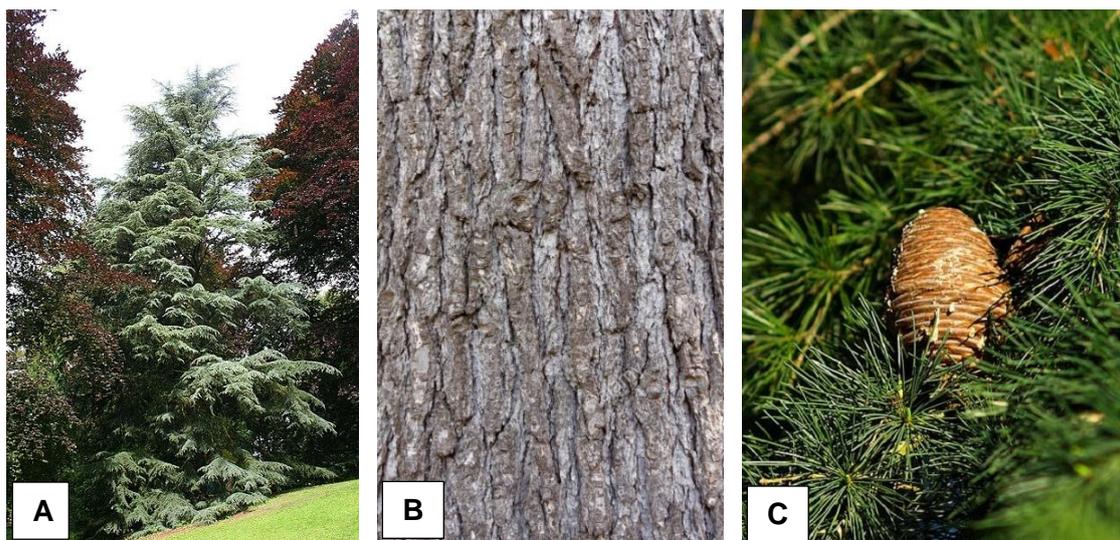
### 2.2.3. Aceite esencial de cedro

#### 2.2.3.1. *Cedrus deodara*

*Cedrus deodara* (D. Don) G. Don o cedro del Himalaya es una especie perteneciente al género *Cedrus*, incluido dentro de la familia Pinaceae. Es originaria de Asia, distribuida por la Cordillera del Himalaya, a lo que debe su nombre vernáculo, en alturas de 1.200 a 3.900 metros de altitud. Se encuentra de forma general plantado en espacios amplios como áreas verdes, plazas y parques, muy adaptable ya que soporta exposiciones totales al sol, de semisombra y de sombra, no lo daña el frío y puede tolerar heladas no muy intensas.

Es una conífera de gran tamaño, de porte piramidal cuando es joven cuya copa toma una forma plana con ramificaciones horizontales cuando madura (Figura 2.A). A los 25 años alcanza su altura máxima, que normalmente oscila entre los 40 y 50 metros, pudiendo llegar a los 60 metros de forma excepcional. Su tronco es cilíndrico y ronda los 3 metros de diámetro, con una corteza lisa y de color ceniza cuando es joven (Figura 2.B). Sus ramas son horizontales y ligeramente colgantes, la copa se inclina al ir avanzando en edad. Sus acículas son de color verde grisáceo, con longitudes entre los 2,5 y los 5 cm y una anchura de 1 mm, aparecen en grupos, dando como resultado un follaje bastante denso. Sus piñas son grandes, con longitudes entre 7 y 13 cm, y anchuras de 5 a 9 cm, con forma de barril (Figura 2.C), cuando maduran se desintegran, dejando que sus semillas aladas se dispersen. Es un árbol de crecimiento rápido y mucha longevidad (Missouri Botanical Garden).

Las hojas de este árbol se emplean como condimento para comidas y bebidas y como tratamiento de reuma, diabetes, cáncer, dolores estomacales e inflamaciones. Los extractos de su madera y corteza se emplean con objetivos médicos, y los extractos de sus raíces como medicamento contra úlceras (Kumar, 2019).



**Figura 2:** Órganos aéreos de *Cedrus deodara* (A), corteza (B) y piña (C) (A: Grandmont, 2007, B: Alamy, C: Portillo, 2008).

### 2.2.3.2. Generalidades de los aceites esenciales de cedro

El aceite esencial de *Cedrus deodara* puede extraerse mediante destilación por arrastre de vapor o hidrodestilación desde diferentes órganos como sus cortezas, raíces u hojas para aprovechar sus diferentes propiedades (Kumar, 2019). Entre ellas encontramos la capacidad insecticida del aceite procedente de su corteza, comprobada sobre plagas de almacén como el gorgojo del arroz (Singh *et al.*, 1989), moscas domésticas o lepidópteros como *Plutella xylostella* L. (Chaudhary *et al.*, 2011); la capacidad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial procedente de sus acículas (Zeng *et al.*, 2012), la capacidad antifúngica del extracto de aceite de corteza de cedro sobre varias especies de *Aspergillus*, entre ellos *Aspergillus flavus* o *Aspergillus sydowii* (Chaudhary *et al.*, 2012), o la capacidad antiinflamatoria del aceite esencial proveniente de su madera, debida a la actividad estabilizadora de membranas (Shinde *et al.*, 1999).

Como ya se ha mencionado, la composición de un aceite esencial va a depender no solo de la especie de la que procede y el órgano del que se extrae, también van a interferir su edad, sanidad, nutrición y método de extracción, entre otros. Teniendo esto en cuenta, la composición determinada por Chaudhary *et al.*, (2011), para el aceite esencial de cedro obtenido de su corteza por hidrodestilación, con un rendimiento del 0,98% (p/p peso seco), se han obtenido las fracciones de pentano, acetonitrilo, atlantona enriquecida y cromatográfico enriquecido con himachaleno, con un total de 40 compuestos a partir de estas fracciones usando análisis de Cromatografía de Gases (GC) y Cromatografía de Gases/Masas (GC-MS). Los pentanos son el grupo más grande, dentro del que se encuentran el 90,89% de los componentes del aceite, entre ellos se incluyen 11 hidrocarburos sesquiterpénicos y 16 sesquiterpenos oxigenados.

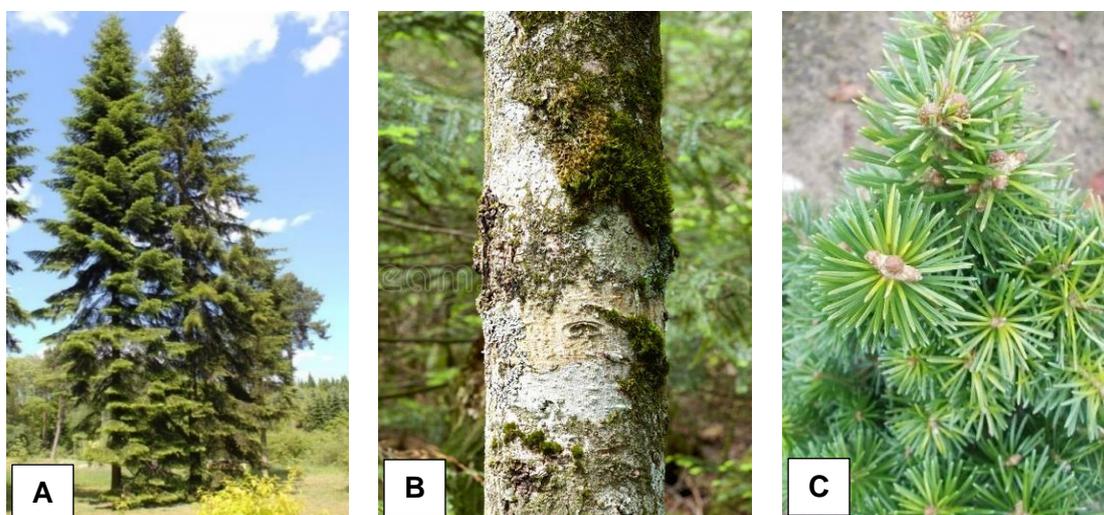
## 2.2.4. Aceite esencial de abeto

### 2.2.4.1. *Abies sibirica*

La especie *Abies sibirica* Ledeb., perteneciente al género *Abies*, dentro de la familia Pinaceae, se conoce de forma común como abeto siberiano, es un árbol originario de Siberia, presente desde la zona norte de Europa hasta el este de Asia, de clima frío boreal, soportando temperaturas por debajo de  $-50^{\circ}\text{C}$ , necesita suelos húmedos con buena adaptación a texturas arenosas, francas, arcillosas y muy arcillosas por su capacidad para mantener la humedad, nada exigente en cuanto a luminosidad, adaptándose desde lugares sombríos hasta aquellos de exposición directa al sol, se encuentra presente en montañas o ríos en alturas de 1.900 a 2.400 metros de altitud (Pérez, 2012).

Árbol perenne que puede alcanzar los 35 metros de altura (Figura 3.A) y su tronco el metro de diámetro, su corteza es lisa, de color pardo grisáceo (Figura 3.B). Ramificación verticilada, con ramas brillantes de color gris amarillento, sus hojas son lineares, aplanadas, ascendentes y discoloras, con dos bandas estomáticas grisáceas. Posee estróbilos femeninos cilíndricos, de 5 a 10 cm de largo y alrededor de 3 cm de diámetro. en la parte superior de la copa (Figura 3.C), con escamas tectrices inclusas y escamas seminíferas caducas que se desarticulan del raquis (Amman, 1999).

Es una especie muy presente en China, su madera se utiliza como material de construcción, elaboración de muebles y como fuente del aceite esencial de abeto de Siberia, con usos medicinales, insecticidas, bactericidas y calmantes (Pérez, 2012).



**Figura 3:** Órganos aéreos de *Abies sibirica* (A), corteza (B) y piñas (C) (A: Crusier, 2010, B: Groshev, 2000, C: Mesterhazy).

### 2.2.4.2. Generalidades de los aceites esenciales de abeto

El aceite esencial de *Abies sibirica* se obtiene mediante destilación por arrastre de vapor desde sus acículas y ramas. Matsubara *et al.*, (2011), han estudiado el potencial de este aceite como reductor del nivel de excitación provocada tras la prolongada exposición de la vista a monitores de computadoras o pantallas de visualización de datos (VDT),

frecuentemente ocasionada en el trabajo. También se ha estudiado la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de abeto, donde se han comprobado sus propiedades antioxidantes (Polyakov *et al.*, 2014), su actividad fungicida sobre hongos aislados de manzanas y verduras, obteniéndose los mejores resultados entre los 4 y 7 días posteriores a la incubación sobre *Aspergillus flavus*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata* y *Penicillium roquefortii* (Surviliené *et al.*, 2019), o su actividad insecticida sobre larvas de *Spodoptera littoralis* o rosquilla negra (Pavela, 2005) sobre larvas y adultos de *Musca domestica* o mosca común (Pavela, 2008), o sobre *Dermanyssus gallinae* o ácaro rojo de las patatas (George *et al.*, 2010), entre otros.

La composición del aceite esencial de *Abies sibirica* ha sido estudiada por varios autores, teniendo en cuenta las variaciones propias del desarrollo de la planta y la obtención del aceite esencial, podemos diferenciar entre la composición del aceite esencial de sus acículas, con un 25-35% de acetato de bornilo, 10-22% de alfa-pineno, 5-15% de delta-careno, 15-26% de canfeno, además de cineol, limonero, beta-pineno, alfa terpineol y borneol, la composición del aceite esencial de sus ramas, con un 34-38% de acetato de bornilo, 17-19% de canfeno, 11% de carene, 8% de alfa-pineno, y la composición del aceite esencial de su corteza, con un 24% de alfa-pineno, un 20% de acetato de bornilo, un 12% de beta-pineno, además de capeno, cariofileno (Chernyaeva y Barakov, 1983).

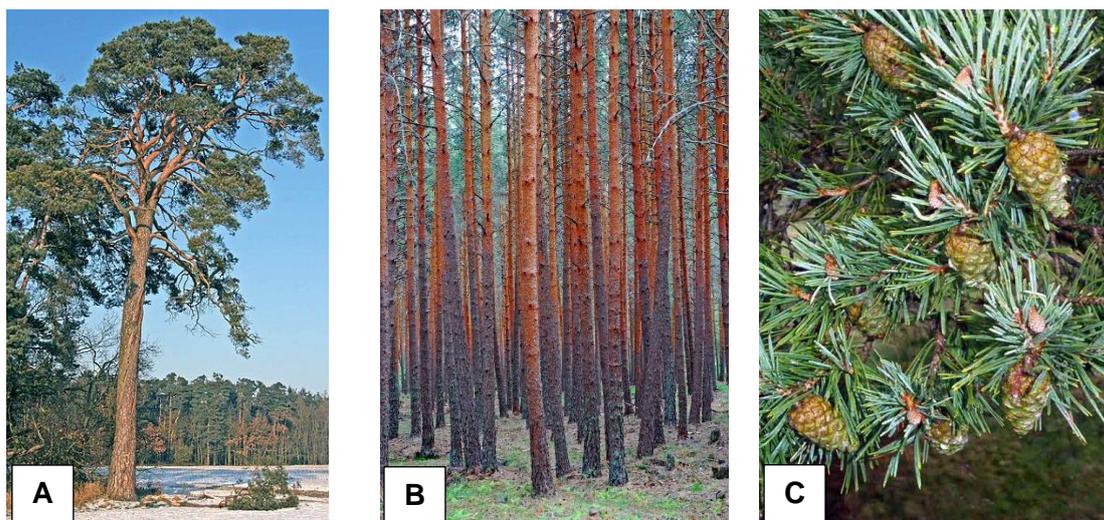
## 2.2.5. Aceite esencial de pino

### 2.2.5.1. *Pinus sylvestris*

El *Pinus sylvestris* L., conocido como pino silvestre, pino albar, pino rojo o pino del norte, es una especie perteneciente al género *Pinus*, dentro de la familia Pinaceae, es un árbol originario de Suecia, ampliamente distribuido por el mundo formando un inmenso cinturón forestal poblando los grandes bosques boreales, probablemente en árbol más extendido por todo el mundo, tanto de forma natural como por su presencia en las repoblaciones. En la Península Ibérica se posiciona como el segundo árbol más extendido, por detrás del pino resinero, extendido de forma natural en la mitad norte y las zonas montañosas del centro y este, y repoblado en otras muchas zonas. Su amplia distribución se debe a su buena adaptación al clima frío y húmedo propio del norte y de las zonas montañosas del sur, no soporta la sequía, necesitando unas precipitaciones suficientes, indiferente al tipo de suelo y propio de altitudes entre los 1000 y 2000 metros sobre el nivel del mar.

Es un árbol de gran porte capaz de alcanzar los 40 metros de altura, de copa piramidal (Figura 4.A). Su tronco es grueso, caracterizado por el tono anaranjado de color salmón que adquiere su parte superior (Figura 4.B), al retirar la parte gruesa de su corteza, la parte interna es de aspecto papiráceo. Sus hojas son de tonos azulados, aciculares, que salen de grupos de dos con entre 2 y 6 cm de largo. Sus piñas son pequeñas, con larguras de entre 3 y 6 cm y aparecen sentadas sobre las ramillas o unidas a ellas con un rabillo muy corto (Figura 4.C). Sus piñones son de tamaño muy pequeño, provistos de un ala que facilita su dispersión tras la apertura de la piña madura.

Posee una madera de gran calidad, confiriéndole a esta especie importancia económica ya que produce fustes largos con pocos nudos muy adecuados para la construcción, elaboración de materiales como tableros, vigas... Además, produce aceites esenciales y resinas empleados en medicina tradicional y alternativa por sus propiedades antisépticas y sus beneficios contra afecciones pulmonares, y en la industria química como aromatizantes desinfectantes (Arbolapp, 2020).



**Figura 4:** Órganos aéreos de *Pinus sylvestris* (A), corteza (B) y piñas (C) (A: Pražák, 2006; B: Arbolapp, 2020; Arbolapp, 2020).

#### 2.2.5.2. Generalidades de los aceites esenciales de pino

El aceite esencial de *Pinus sylvestris* se obtiene por arrastre de vapor de sus agujas y conos, se ha estudiado ampliamente en diferentes ámbitos. En medicina, Lazutka *et al.* (2001) han estudiado la capacidad genotóxica del aceite esencial de agujas de pino silvestre sobre linfocitos humanos, obteniendo toxicidad sobre estos, también se ha estudiado su selectividad sobre células de cáncer de mama, demostrándose cierto potencial como agente quimiopreventivo o quimioterapéutico (Hoi *et al.*, 2015), el aceite esencial de sus conos se ha investigado para demostrar sus propiedades antioxidantes (Yang *et al.*, 2010); el uso de estos aceites en el ámbito de la agricultura se ha mencionado ya en el apartado 2.2.2.1. *Los aceites esenciales en la agricultura*, donde se habla de su capacidad como bioherbicidas de origen natural, pero también se ha estudiado su capacidad insecticida, como Fayemiwo *et al.*, (2014), que han demostrado su capacidad larvicida sobre mosquitos; o su capacidad inhibitoria sobre bacterias, hongos y virus, obteniendo control sobre *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli*, pero no sobre ninguno de los hongos estudiados (Chao *et al.*, 2000).

El aceite esencial obtenido por arrastre de vapor de acículas de *Pinus sylvestris* analizado por Ustun *et al.* (2006) lo forman 43 componentes, los mayoritarios son alfa-pineno (19-57%), canfeno (6-11%) y beta-pineno (3-17%). El aceite esencial obtenido de los conos de *Pinus sylvestris* estudiado por Yang *et al.* (2010) contiene un total de 57 componentes identificados, los mayoritarios son alfa-pineno (20,92%), delta-limoneno (15,75%), beta-pineno (4,91%) y trans-pinocarveol (4,76%).

## 2.3. Malas hierbas

### 2.3.1. Generalidades de las malas hierbas

Las malas hierbas, mejor denominadas flora arvense o adventicia, son las plantas asociadas a los cultivos que crecen donde no se desea que lo hagan. Estas se han extendido de forma global, encontrando en cada parte del mundo flora autóctona junto con otra que ha sido introducida procedente de otros lugares, de forma más o menos reciente.

Las principales características de las malas hierbas son su alta capacidad de dispersión, su gran persistencia y su alta competitividad, estas tres características son las que hacen que sean problemáticas para los cultivos, reduciendo su rendimiento, interrumpiendo canalizaciones de agua e interviniendo en los procesos de cosecha y comercialización (Peralta y Royuela, 2019).

#### 2.3.1.1. Clasificación

Podemos organizar las malas hierbas según su ciclo de vida, entendiendo este como el período comprendido desde la germinación de la semilla hasta la decrepitud y muerte de la planta adulta, según esto, y siguiendo la clasificación de Recasens y Conesa (2009), podemos diferenciar entre plantas anuales, bienales y plurianuales.

##### Plantas anuales

La mayoría de malas hierbas presentan este ciclo de vida, son aquellas con un ciclo de vida inferior a un año. Su consistencia es herbácea, con una única forma de dispersión mediante semillas y son capaces de adaptarse a muchos cultivos, especialmente a aquellos de ciclo de vida también anual, como cereales de invierno, maíz, girasol, arroz y cultivos hortícolas. Dentro de este grupo se diferencian las especies de invierno y las de verano, según la época en la que inician su germinación:

##### – *Especies de invierno*

Plantas anuales que inician su floración entre los meses de otoño o invierno, continúan con su desarrollo vegetativo y floración durante la primavera y alcanzan su decrepitud a principios de verano. Dentro de este grupo encontramos especies como *Avena sterilis*, *Lolium rigidum*, *Bromus diandrus* o *Phalaris minor*.

##### – *Especies de verano*

Estas, al contrario que las de invierno, son las plantas anuales que inician su germinación a principios de primavera, muestran su desarrollo vegetativo durante el verano y desaparecen en otoño. Aquí encontramos especies como *Portulaca oleracea*, *Salsola Kali*, *Digitaria sanguinalis* o *Echinochloa cruz-galli*.

##### Plantas bienales

Dentro de esta categoría se incluyen las especies de plantas cuyo ciclo de vida tiene una duración entre uno y dos años. Durante el primer año se produce la germinación y desarrollo vegetativo de las plantas, dándose durante el segundo año su floración y fructificación. Son de consistencia herbácea, generalmente germinan durante el invierno o la primavera del primer año, y a lo largo de este se desarrollan vegetativamente hasta

conformar la estructura en roseta que les permita sobrevivir al siguiente invierno, salvo casos de inviernos con temperaturas suaves, donde estas no cesan su desarrollo vegetativo. Dentro de este grupo encontramos *Picris echioides*, *Daucus carota*, *Conyza sumatrensis* o *Cirsium vulgare*.

### Plantas plurianuales

En este grupo se encuentran aquellas plantas cuyo ciclo de vida es superior a dos años. Pueden ser herbáceas o leñosas y se pueden distinguir dos tipos dependiendo cómo pasan el invierno: perennes y vivaces. Las primeras son aquellas que siempre presentan un órgano aéreo funcional, pueden ser herbáceas o leñosas, como *Medicago sativa*, *Festuca pratensis* o *Lolium perenne*; la vivaces son todas herbáceas y pierden totalmente sus órganos aéreos durante el invierno, conservando yemas de renovación como órganos subterráneos en forma de rizomas, estolones, bulbos, tubérculos o raíces, en este grupo encontramos *Sorghum halepense*, *Muscari neglectum*, *Cyperus rotundus* o *Convolvulus arvensis*.

#### 2.3.1.2. Identificación

Las malas hierbas que encontramos en agricultura son todas plantas vasculares, y pueden agruparse de forma general en: Pteridofitas o helechos y Antofitas o plantas con flores, dentro de las plantas con flores distinguimos monocotiledóneas y dicotiledóneas. Para su identificación contamos con tres grupos, que son los helechos, las monocotiledóneas y las dicotiledóneas (Peralta y Royuela, 2019).

### Helechos

Este grupo de plantas vasculares se reproduce por esporas que son producidas por los esporangios, carecen de flores y semillas. Lo forman alrededor de 11.000 especies, aunque no suelen presentar una gran incidencia como malas hierbas.

### Monocotiledóneas

Las monocotiledóneas, comúnmente llamadas malas hierbas de hoja estrecha, comprenden alrededor de 50.000 especies del total de 250.000 de las especies conocidas de plantas con flores, un número bastante limitado, pero enormemente competitivas en cultivos de cereales de invierno. En este grupo encontramos gramíneas como *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Avena sterilis*, *Bromus spp.* o *Lolium rigidum* (vallico) y liliáceas como *Muscari comosum*.

Se caracterizan por sus flores, normalmente formadas por corola, androceo y gineceo, un crecimiento secundario generalmente ausente, la nerviación de sus hojas es paralelinervia, sus raíces son adventicias y se desarrollan a partir de nudos del tallo sustituyentes de la radícula, sus semillas son de un único cotiledón y poseen haces vasculares dispuestos por el tallo, sus granos de polen normalmente tienen una única apertura y sus inflorescencias se encuentran en panículas o espigas.

### Dicotiledóneas

Este conjunto es mucho más numeroso, lo conforman unas 200.000 especies, entre ellas encontramos *Anacyclus clavatus*, *Chenopodium álbum*, *Fumaria officinalis* o *Rumex crispus*.

Las flores de las cotiledóneas normalmente están formadas por cáliz, corola, androceo y gineceo, con crecimiento secundario a partir del cambium vascular, que produce la madera y la corteza de las plantas leñosas, la nerviación de sus hojas es pinnada o reticulada, con raíz principal desarrollada desde la radícula, semillas con dos hojas embrionarias o cotiledones, haces vasculares formando anillos y granos de polen con tres surcos o poros.

### 2.3.1.3. Métodos de control

Para obtener éxito en la producción agrícola se hace esencial el control de las malas hierbas presentes en la explotación. Este manejo deberá ser planificado y estructurado teniendo en cuenta consideraciones económicas y ecológicas y previsiones a corto y largo plazo.

Los principales métodos de control de malas hierbas, según Peralta y Royuela (2019), se describen a continuación:

- **Métodos preventivos:** aquellos con los que se pretende evitar la introducción de las especies arvenses. Aquí encontramos medidas legales, limpieza y vigilancia de material de siembra, limpieza de maquinaria y márgenes, evitar la entrada de ganado de zonas infestadas y colocación de filtros en sistemas de riego.
- **Métodos agronómicos:** aquellas operaciones culturales y de manejo de cultivo que van a tratar de impedir la aparición de malas hierbas, tales como la rotación de cultivos, el empleo de cultivos y variedades adecuadas capaces de competir con la flora arvense, adecuadas prácticas agronómicas vigilando la fecha y densidad de siembra y la adecuada fertilización, entre otras, y el empleo de coberturas vegetales vivas temporales o permanentes en cultivos leñosos.
- **Métodos mecánicos:** empleo de laboreo y métodos físicos para la eliminación de la flora arvense ya presente en la parcela como siega, solarización, radiaciones microondas o ultravioleta y empleo de cubiertas inertes de empajado, cortezas, serrín, y barreras estáticas mediante plásticos, cartón o papel.
- **Métodos biológicos:** empleando organismos vivos para combatir las malas hierbas, diferenciándose dos técnicas: la clásica, con animales herbívoros e insectos, y la inundativa, mediante inoculación de fitopatógenos como hongos, nemátodos, bacterias o virus.
- **Métodos químicos:** consisten en la utilización de herbicidas, que son compuestos químicos tóxicos para alguna o todas las plantas, para la eliminación de estas.

### 2.3.2. Especies vegetales empleadas en el estudio

A continuación, se describen las especies de malas hierbas seleccionadas para la realización de esta evaluación de aceites esenciales, así como la planta de tabaco que hemos tomado como ejemplo de cultivo.

#### 2.3.2.1. *Linum usitatissimum* L.

*Linum usitatissimum* L., conocido como lino, pertenece al género *Linum*, enmarcado dentro de la familia Linaceae. Es una planta anual que florece y fructifica durante casi todo el año, originaria de Europa y el Cercano Oriente, con distribución ruderal, de zonas tropicales y bosques mixtos con predominio de pinos y encinos. Los tallos de sus fibras se han empleado en la fabricación de telas y papeles finos y sus semillas han servido para la extracción de aceite de melaza y para consumo medicinal y condimentos.

Planta herbácea, de hasta un metro de altura, glabra o con muy pocos pelos, de tallo erecto, estriado y, en ocasiones, ramificado cerca de la base y en la inflorescencia (Figura 5.A). Sus hojas son alternas, sésiles, muy estrechas, puntiagudas, con una largura máxima de 4 cm y con 1 o 3 nervios marcados (Figura 5.B). Sus inflorescencias dispuestas en panículas corimbiformes se encuentran en la punta de los talos, acompañadas de hojas más pequeñas. Poseen unas flores vistosas con 5 pétalos de color azul o raramente blancos (Figura 5.C) que dan lugar a frutos en cápsula globosa, puntiaguda y a veces con pelillos, con generalmente 10 semillas comprimidas, de color café a negruzcas (Hanan y Mondragón, 2009a).



**Figura 5:** Órganos aéreos de *Linum usitatissimum* (A), hojas (B) y flor (C) (A: Cueto, 2014; B, Tenorio, 2000; C: Tenorio, 2000).

#### 2.3.2.2. *Lolium multiflorum* Lam.

La especie *Lolium multiflorum* Lam. pertenece al género *Lolium*, dentro de la familia Poaceae. Es una planta herbácea bienal, aunque también puede ser anual según sus variedades, originaria de Europa, cultivada para forraje en climas fríos y húmedos, aunque en otras situaciones aparece como mala hierba conocida como ray-grass italiano o vallico (Proyecto Anthos, 2012). Es una especie frecuente en prados en altitudes superiores que aparece como mala hierba en cultivos posteriores a los pastizales o en parcelas abonadas con materia orgánica de origen animal.

Planta glabra, de tallo erecto (Figura 6.A) de sección circular y base rojiza, con las hojas largas y anchas de nervios bien marcados y envés muy brillante, con dos aurículas largas y una lígula visible (Figura 6.B). Posee espiguillas sésiles de varias flores, alternas, dispuestas en lados opuestos del raquis continuo (Figura 6.C); la primera gluma está ausente, sus lemas tienen forma redondeada en el dorso, aristadas obtusas o sin arista. Sus semillas se diferencian del resto de vallicos por su tamaño mayor y por poseer una arista (Swallen, 1955).



**Figura 6:** Órganos aéreos de *Lolium multiflorum* (A), inserción de la hoja en el tallo (B) e inflorescencia (C) (A: Peralta y Royuela, 2019; B: Proyecto Anthos, 2012); C: Peralta y Royuela, 2019).

#### 2.3.2.3. *Lolium perenne* L.

*Lolium perenne* L. es una planta perenne perteneciente al género *Lolium*, enmarcada dentro de la familia Poaceae, nativa de Europa, de cultivo extendido por todas las regiones templadas del planeta para la producción de forraje, conocida como ray-grass inglés o vallico (Proyecto Anthos, 2012).

Su altura varía entre los 10 y los 80 cm, es de naturaleza cespitosa (Figura 7.A), con los tallos lisos. Sus hojas tienen una lígula membranosa de hasta 2 mm y poseen aurículas (Figura 7.B). Generalmente cuando es joven su vaina basal es de color rojizo. Inflorescencia en espiga, con el raquis rojizo (Figura 7.C), sus espiguillas tienen una sola gluma con longitud variable entre los 2/3 y el total de la longitud de la espiguilla, posee entre 2 y 11 flores, sus lemas no son aristadas (Peralta y Royuela, 2019).

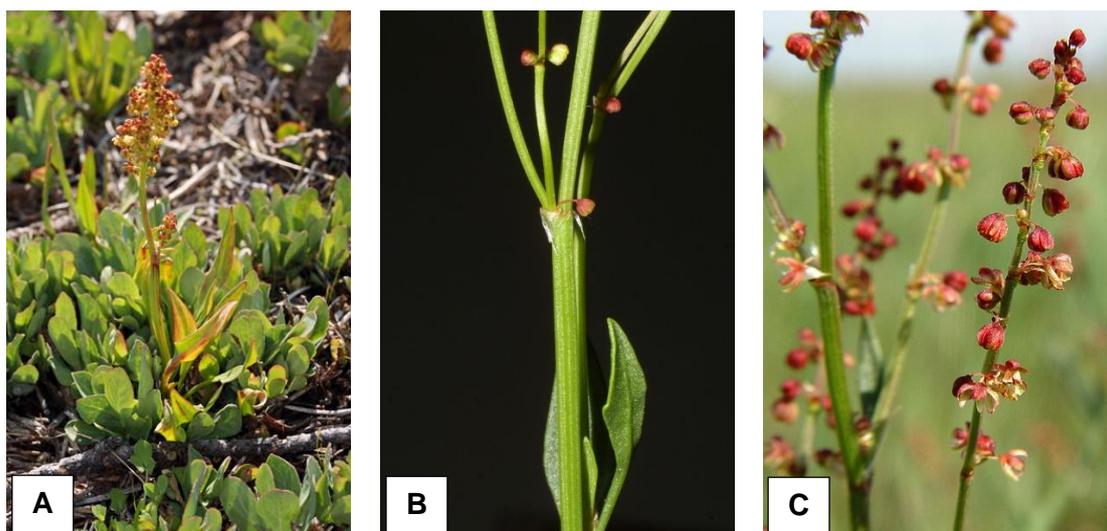
#### 2.3.2.4. *Rumex acetosella* L.

*Rumex acetosella* L. es una especie perteneciente al género *Rumex* perteneciente a la familia Polygonaceae, de origen euroasiático, ampliamente distribuida por el mundo, propia de pastizales secos silícolas y frecuente en cultivos de avena y maíz (Peralta y Royuela, 2019).

Planta herbácea perenne, generalmente dioica, con apariencia delicada y rizoma reptante, sin pelos. Su tallo puede ser erguido o estar tendido en el suelo manteniendo las puntas ascendentes, de color verde con toques rojizos (Figura 8.A). En el lugar donde nace cada hoja, rodeando al tallo, se encuentra la ócrea, translúcida y frecuentemente rojiza (Figura 8.B). Sus hojas son alternas, situadas sobre largos pecíolos de 1 a 10 cm de largo; de lámina oblonga elíptica o lanceolada de hasta 6 cm de largo con dos pequeños lóbulos triangulares cerca de la base. Las hojas superiores son más pequeñas y carecen de lóbulos en la base. La inflorescencia la forman flores diminutas, de color rojo o amarillo, dispuestas en finas panículas en las puntas de los tallos (Figura 8.C) (Hanan y Mondragón, 2009b).



**Figura 7:** Órganos aéreos de *Lolium perenne* (A), inserción de la hoja en el tallo (B) e inflorescencia (C) (A: Proyecto Anthos, 2012; B: Peralta y Royuela, 2019; C: Emorsgate seeds, 2004).



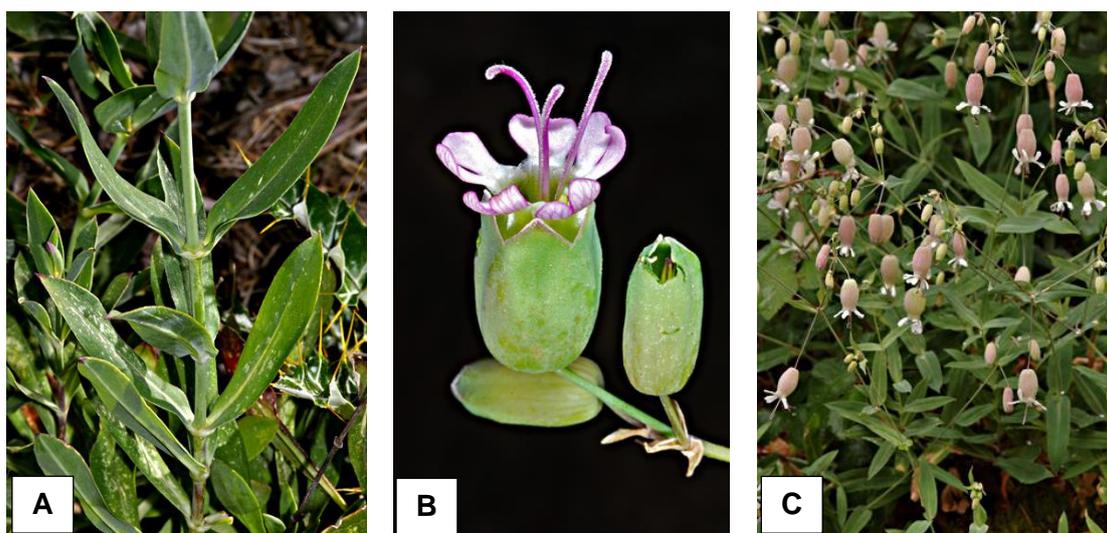
**Figura 8:** Órganos aéreos de *Rumex acetosella* (A), tallo con restos de ócrea (B) y fructificación (C) (A: Matson, 2008; B: Baskauf, 2021; C: Withman, 2004).

#### 2.3.2.5. *Silene inflata* Sm.

*Silene inflata* Sm., también conocida como *Silene vulgaris* (Moench) Garcke subsp. *vulgaris* (The plant list, 2010), es una especie perteneciente al género *Silene*, dentro de la familia *Caryophyllaceae*, originaria de la región mediterránea y ampliamente distribuida por esta, presente en toda Europa, norte de África y zona central de Asia. Ocupa casi todo el territorio de la Península Ibérica, salvo las zonas más elevadas y es frecuente encontrarla en bordes de caminos, terrenos alterados y cultivos, especialmente en cereales de secano. Tiene usos gastronómicos por toda la región mediterránea, se

consumen sus hojas y tallos tiernos, ya sea en crudo o hervidos. Entre sus nombres vernáculos, el más extendido es el de colleja.

Esta es una planta de porte herbáceo, perenne y glabra por todas sus partes. Sus tallos son erguidos, de coloración grisácea, escasamente cespitosos que alcanzan entre los 35 y 80 cm de altura. Sus hojas son coriáceas, opuestas y lanceoladas, con las inferiores pecioladas y las medias sésiles (Figura 9.A). Posee flores hermafroditas, con pétalos blancos o rosa pálido divididos en dos lóbulos, sus sépalos se encuentran soldados e inflados (Figura 9.B), agrupadas generalmente en inflorescencias con muchas flores (Figura 9.C). Su fruto se encuentra en una cápsula globosa, con 6 dientes erectos, con semillas pequeñas globoso-reniformes (Peralta y Royuela, 2019).

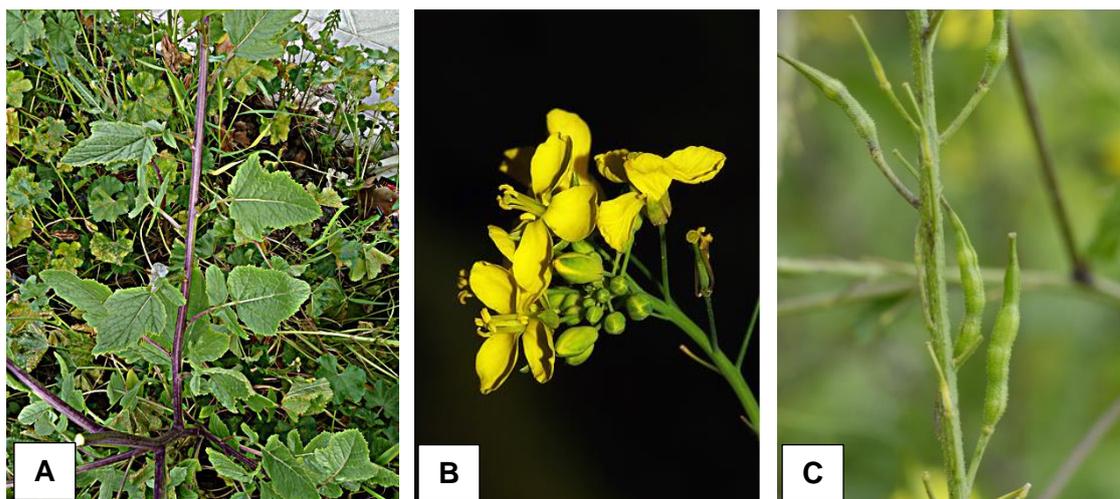


**Figura 9:** Órganos aéreos de *Silene inflata* (A), detalle de la flor (B) e inflorescencias (C) (A, B, C: Proyecto Anthos, 2012).

#### 2.3.2.6. *Sinapis arvensis* L.

La especie *Sinapis arvensis* L. es una planta del género *Sinapis*, perteneciente a la familia Brassicaceae. Es nativa de Europa, pero está ampliamente naturalizada en Norteamérica, propia de terrenos removidos, bordes de caminos y cultivos de secano como cereales y frutales, y suelos básicos no muy fertilizados. Su nombre vernáculo más extendido es el de mostaza silvestre, este se debe a que semillas pueden utilizarse en alimentación al igual que las de mostaza blanca, aunque se recomienda un uso moderado dada su toxicidad en dosis elevadas.

Es una planta de consistencia herbácea, anual. Sus tallos son erguidos con alturas entre los 20 y 80 cm (Figura 10.A) y en la base son hispídos, al igual que sus hojas, que pueden alcanzar hasta 30 cm de longitud, las inferiores son pecioladas con el lóbulo terminal muy grande y las superiores sésiles, dentadas o un poco lobuladas. Las flores tienen los pétalos amarillos, agrupadas en racimos con más de 20 flores (Figura 10.B), producen un fruto en silicua ancha, de más de 2 mm, con nervios en las valvas y un pico de más de 1 cm (Figura 10.C) (Peralta y Royuela, 2019).



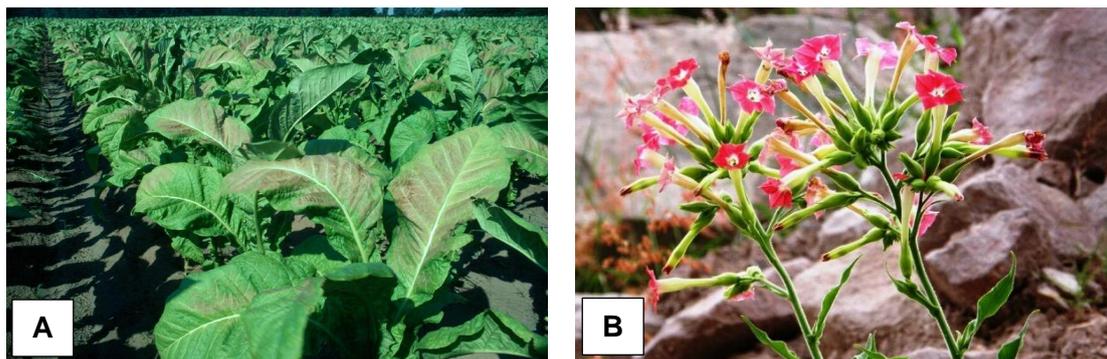
**Figura 10:** Órganos aéreos de *Sinapis arvensis* (A), inflorescencias (B) y detalle del fruto (C) (A, B, C: Proyecto Anthos, 2012).

#### 2.3.2.7. *Nicotiana tabacum* L.

El tabaco o *Nicotiana tabacum* L. es una planta del género *Nicotiana*, dentro de la familia Solanaceae. No es considerada como mala hierba, pero se ha incluido en este estudio por tratarse de un modelo vegetal ampliamente utilizado en la ciencia.

Es originaria de la zona andina, al sur del continente americano, extendiéndose su cultivo tras la colonización de América en zonas con altitudes de los 0 a los 600 metros sobre el nivel del mar, prefiriendo temperaturas uniformes y con sensibilidad a las temperaturas bajas y las heladas. Su producción está dedicada a comercializar únicamente la hoja de la planta, considerada como producto agrícola no alimenticio, estas hojas se secan y se pueden masticar, fumar y utilizar como pesticida y como protagonista en la elaboración de algunos remedios caseros, su producción más importante es destinada a la fabricación de cigarros, puros y tabaco para pipa (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018).

Se trata de una especie perenne dicotiledónea, de tamaño medio, alcanzando alturas entre los 50 cm y los 2 m. Sus tallos se mantienen erguidos y están cubiertos de pelos glandulares blancos, tiene hojas grandes que superan los 50 cm de longitud en algunas variedades, de bordes enteros y peludos, alternas, ovales y lanceoladas, con nervios centrales gruesos (Figura 11.A). Sus flores se agrupan en racimos y nacen en la parte más alta de los tallos, sus 5 pétalos fusionados forman una trompeta y sus coloraciones van desde el blanco verdoso al rosa (Figura 11.B), dando lugar a frutos en cápsula cónica que contienen semillas diminutas (Tabacopedia, 2015).



**Figura 11:** Órganos aéreos de *Nicotiana tabacum* (A) e inflorescencias (B) (A, B: Proyecto Anthos, 2012).

### 3. OBJETIVOS

La motivación de este estudio Fin de Máster es investigar la capacidad de diferentes sustancias naturales como posibles agentes de control biológico eficaces contra malas hierbas mediante un estudio riguroso y objetivo teniendo en cuenta anteriores investigaciones.

Con los resultados obtenidos en este estudio se pretende apoyar la utilización de sustancias naturales para la protección de cultivos y contribuir al desarrollo de productos basados en estas sustancias naturales como herramientas eficaces y sostenibles para el manejo de malas hierbas en explotaciones agrícolas.

Por ello, se ha planteado el siguiente objetivo general:

- Evaluar la capacidad de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino para controlar la nascencia y el desarrollo de las especies arvenses de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Rumex acetosella*, *Silene inflata* y *Sinapis arvensis* y del cultivo de *Nicotiana tabacum*.

Este objetivo general podemos desglosarlo en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar *in vivo* la capacidad de los aceites esenciales para la inhibición de la germinación de las especies *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Rumex acetosella*, *Silene inflata* y *Sinapis arvensis* mediante su aplicación por riego en semilleros.
- Evaluar *in vivo* la capacidad de los aceites esenciales de cedro y abeto para la inhibición o reducción del desarrollo de las especies de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Silene inflata* mediante una segunda aplicación por riego en semilleros.
- Evaluar *in vivo* la capacidad del aceite esencial de cedro para la inhibición o reducción del desarrollo de las especies *Lolium multiflorum*, *Silene inflata* y *Nicotiana tabacum* mediante su aplicación por pulverización sobre el follaje.
- Evaluar *in vitro* la capacidad de los aceites esenciales para la inhibición de la germinación de las especies *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Nicotiana tabacum* mediante su aplicación por pipeteado en placas de Petri.

Los tres últimos objetivos específicos se han ajustado a las circunstancias e incidencias que se dieron a lo largo del desarrollo del trabajo.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se han realizado diferentes ensayos para determinar la capacidad de control de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino como posibles agentes de control biológico de seis especies de malas hierbas y el cultivo de tabaco. Todos los ensayos se han diseñado de forma representativa, empleando en cada caso tres repeticiones y un control.

### 4.1. Material vegetal

En el presente estudio se han utilizado 7 especies vegetales, todas obtenidas a partir de semillas del banco de germoplasma de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (ETSIAA) de Palencia, Universidad de Valladolid, conservadas mediante congelación.

En la tabla 2 se muestran las especies utilizadas en el ensayo, se indica la familia a la que pertenecen y su capacidad germinativa, evaluada por Reol (2014) en el caso de las malas hierbas, y por Arroyo-Gallardo (2012) en el caso de la especie de tabaco. Para el ensayo se han empleado las especies que habían mostrado mejores resultados de germinación y que contaban con un número adecuado de semillas dentro de la colección.

**Tabla 2:** Especies vegetales empleadas en el ensayo y capacidad germinativa teórica (Arroyo-Gallardo, 2012; Reol, 2014).

Espece	Familia	Germinación (%)
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linaceae	100
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Gramineae	100
<i>Lolium perenne</i> L.	Gramineae	100
<i>Rumex acetosella</i> L.	Polygonaceae	100
<i>Silene inflata</i> Sm.	Cariophyllaceae	100
<i>Sinapis arvensis</i> L.	Brassicaceae	100
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Solanaceae	100

La germinación de las semillas se ha llevado a cabo en semilleros mantenidos en condiciones de temperatura y humedad controladas dentro del invernadero de la ETSIAA. Los diferentes ensayos se han ido ajustando en función de la germinación real de las semillas guardadas.

### 4.2. Aceites esenciales

Para la realización de este ensayo de control biológico se han empleado productos comerciales de herbolario: aceite esencial de madera de cedro del Himalaya (Mystic Moments), *Cedrus deodara* (D. Don) G. Don, aceite esencial de aguja de abeto siberiano (AROMATIKA trust the power of nature), *Abies sibirica* Ledeb., y aceite esencial de aguja de pino escocés (AROMATIKA trust the power of nature), *Pinus sylvestris* L.

Se han empleado tratamientos a diferentes concentraciones de aceite esencial puro, los preparados utilizados se han obtenido a partir de distintas cantidades de aceite esencial

puro de cedro, abeto o pino, variables según la concentración deseada, diluidos primeramente en etanol absoluto para facilitar su solubilidad y, después, en agua hasta alcanzar el volumen de producto preparado necesario. De este modo se han obtenido concentraciones de aceites esenciales dosificados al 2,5%, 1% y 0,5% (25.000 ppm, 10.000 ppm y 5000 ppm) en los ensayos realizados en semilleros, y dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% (25.000 ppm, 5000 ppm y 500 ppm) en el ensayo realizado en placas de Petri.

### **4.3. Ensayos de germinación de semillas en semilleros mediante riego**

El ensayo de control biológico de germinación se ha realizado *in vivo* sobre las especies *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Rumex acetosella*, *Silene inflata* y *Sinapis arvensis*, colocando sus semillas en semilleros de plástico, con una semilla en cada celda. Se han empleado 9 celdas por especie para cada repetición, con 3 repeticiones por tratamiento (marcadas con distintos colores): cedro (naranja), abeto (amarillo) y pino (verde); y control (rojo), tal como se observa en las Figuras 12 y 13.

Los preparados utilizados para los tratamientos se han obtenido a partir de 2,5 ml del aceite esencial puro, diluidos en 10 ml de etanol absoluto y, después, en 87,5 ml de agua por cada 100 ml de producto preparado, obteniendo así aceites esenciales dosificados al 2,5%. Estos tratamientos se han aplicado mediante riego de los semilleros el día en el que se han sembrado las semillas.

- Tratamientos con aceites de cedro, abeto y pino al 2,5% el día de la siembra:

9 celdas x 6 especies x 3 repeticiones x (3 tratamientos aceite + 1 control).

Las semillas se han sembrado y tratado el 2 de octubre de 2020, la primera toma de datos se ha realizado a los 11 días del tratamiento, con sucesivas tomas de datos a los 14, 18 y 21 días del tratamiento y al día número 52 se realizó la última toma de datos, dándose por concluido el experimento de los efectos de los aceites esenciales con un único riego.

### **4.4. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros mediante un segundo tratamiento por riego**

El ensayo de control biológico de la supervivencia se ha realizado *in vivo* sobre las tres especies arvenses que presentaron buena germinación: *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Silene inflata*, aplicando un segundo tratamiento mediante riego con los dos aceites que presentaban mejor resultado en los ensayos de un solo riego, de la misma manera, se han empleado 9 celdas por especie para cada repetición, con 3 repeticiones por tratamiento: cedro y abeto, y control.

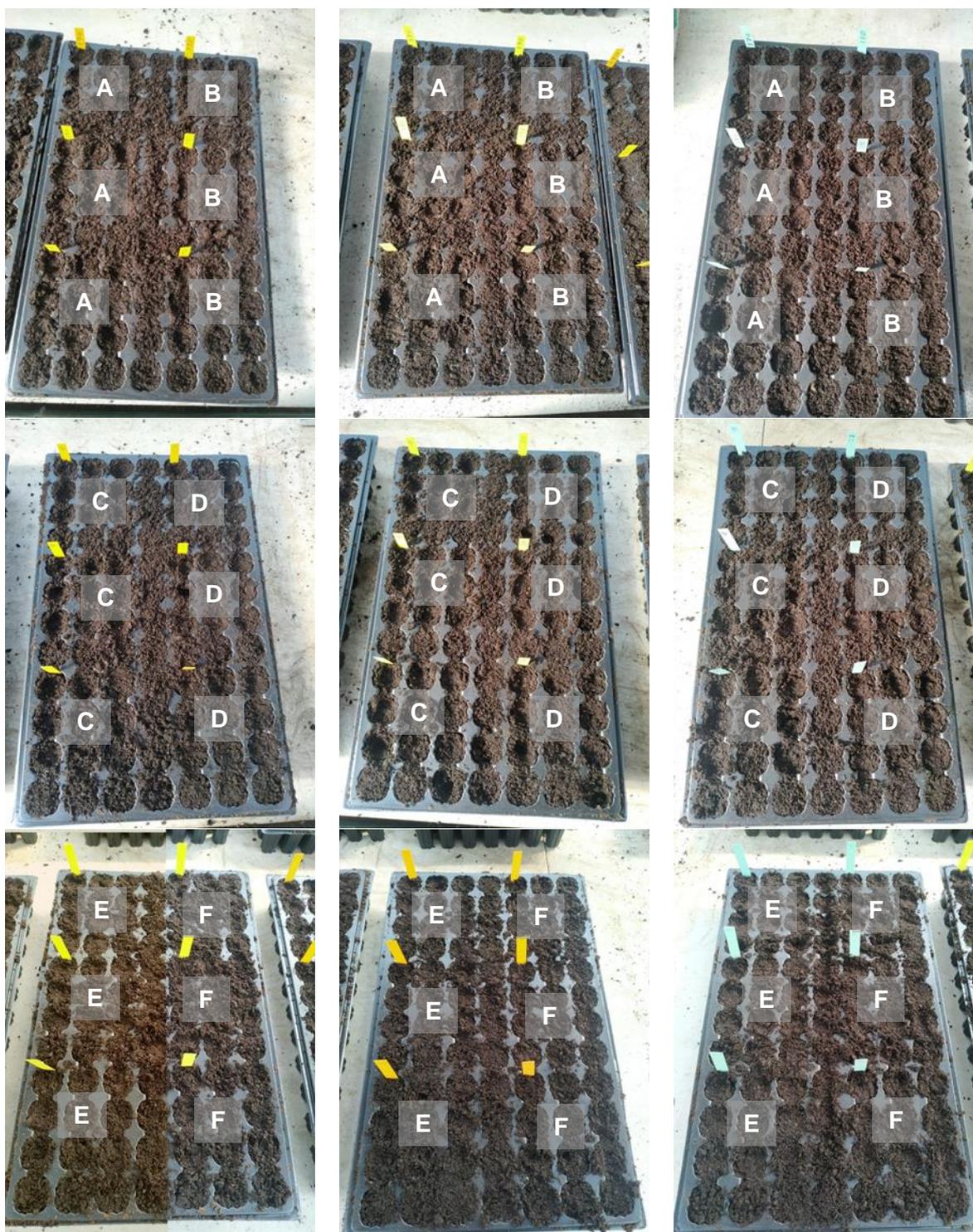
Los preparados utilizados para los tratamientos son los aceites esenciales de cedro y abeto, dosificados al 2,5%, aplicados mediante riego en los semilleros.

- Tratamientos con aceites de cedro y abeto al 2,5% con doble riego:

9 celdas x 3 especies x 3 repeticiones x (2 tratamientos aceite + 1 control).

El segundo tratamiento mediante riego con aceites esenciales se realizó el 24 de noviembre de 2020 sobre bandejas que presentaban el 100% de germinación a los 52

días de la primera dosis, y pasados 15 días se realizó la toma de datos para conocer los resultados.



**Figura 12:** Semilleros con semillas de *Sinapis arvensis* (A), *Silene inflata* (B), *Lolium multiflorum* (C), *Linum usitatissimum* (D), *Rumex acetosella* (E) y *Sinapis arvensis* (F) con su correspondiente tratamiento con aceite esencial de cedro (columna izquierda), abeto (columna central) y pino (columna derecha) dosificados al 2,5%.



**Figura 13:** Semillero con los controles de las especies utilizadas en el ensayo, de arriba abajo: *Lolium perenne*, *Rumex acetosella*, *Sinapis arvensis*, *Silene inflata*, *Lolium multiflorum* y *Linum usitatissimum*.

#### 4.5. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros mediante pulverización

El ensayo de control biológico de desarrollo de plantas se ha realizado *in vivo* sobre las especies *Lolium multiflorum*, *Silene inflata* y *Nicotiana tabacum* en estado adulto tras la germinación y desarrollo de sus semillas sembradas a voleo en semilleros de plástico. La tolerancia de las plantas de las tres especies con una edad de unas seis semanas se ha ensayado mediante pulverización sobre las hojas de aceite esencial de cedro al 2,5%, además se ha realizado otro ensayo del aceite esencial de cedro pulverizado sobre *Nicotiana tabacum* con dos nuevas dosis: de 1% y del 0,5% para comprobar su fitotoxicidad sobre el cultivo.

En la primera parte de este ensayo se han empleado 12 celdas por especie para cada repetición, con tres repeticiones del único tratamiento empleado: preparado de aceite esencial de cedro a 2,5%, y 3 controles. En la segunda parte se han realizado 3 tratamientos diferentes, cada uno con 12 celdas para la única especie empleada, con 3 repeticiones y también con un control por cada repetición.

- Tratamiento con aceite de cedro al 2,5%:  
12 celdas x 3 especies x 3 repeticiones x (1 tratamiento + 1 control).
- Tratamiento con aceite de cedro al 1%:  
12 celdas x 1 especie x 3 repeticiones x (1 tratamiento + 1 control).
- Tratamiento con aceite de cedro al 0,5%:

12 celdas x 1 especie x 3 repeticiones x (1 tratamiento + 1 control).

La toma de datos para el análisis de los resultados se ha realizado en los tres casos a los 5 días de realizar los tratamientos.

#### 4.6. Ensayos de germinación en placas

El ensayo de control biológico de germinación se ha desarrollado *in vitro* sobre las especies de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Nicotiana tabacum*, colocando sus semillas en placas de Petri, con un disco de papel de filtro y un mínimo de 12 semillas en cada placa, tal como se muestra en la Figura 14. En cada placa se ha realizado el tratamiento pertinente, aplicando mediante pipeteado 1 ml del aceite ajustado a su dosificación correspondiente. Para cada especie se han empleado 9 tratamientos, con 3 aceites esenciales a 3 dosis diferentes, con 4 repeticiones y un control por especie. Las dosis empleadas son del 2,5% o 25000 ppm, 0,5% o 5000 ppm y del 0,05% o 500 ppm.

- Tratamientos con aceite de cedro al 2,5, 0,5 y 0,05%:

1 placa x 3 especies x 3 dosificaciones x 4 repeticiones + 1 control.

- Tratamiento con aceite de abeto al 2,5, 0,5 y 0,05%:

1 placa x 3 especies x 3 dosificaciones x 4 repeticiones + 1 control.

- Tratamiento con aceite de pino al 2,5, 0,5 y 0,05%:

1 placa x 3 especies x 3 dosificaciones x 4 repeticiones + 1 control.

El ensayo se ha realizado en el laboratorio y las placas se han mantenido a temperatura ambiente, se han realizado 4 tomas de datos, llevadas a cabo a los 2, los 5, los 13 y los 20 días desde el tratamiento.



**Figura 14:** Placas de Petri con semillas de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Nicotiana tabacum* y su correspondiente tratamiento.

## 4.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos preliminares se han realizado con el software STATGRAPHICS Centurión XVI Versión 16.1.17 32-bits. Cuando los resultados han indicado que se cumple la normalidad y homocedasticidad de los datos se ha realizado el análisis de la varianza con un factor (ANOVA simple) con el programa STATISTICA v.9. empleando como variable dependiente el porcentaje de supervivencia/germinación de la especie, y como factor el tratamiento utilizado con los diferentes aceites. En los casos en que el análisis ANOVA ha dado como resultado diferencias significativas, se determina dónde está la diferencia mediante el análisis por pares con el método LSD de Fisher.

En el caso de la germinación en placas Petri no se cumplieron las condiciones de homocedasticidad (test de Levene) y por ello los análisis estadísticos se realizaron con test no paramétricos: test de Kruskal-Wallis para la evaluación de las variables y test U de Mann-Whitney para las comparaciones por pares posteriores cuando el test de Kruskal-Wallis indicaba diferencias estadísticamente significativas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

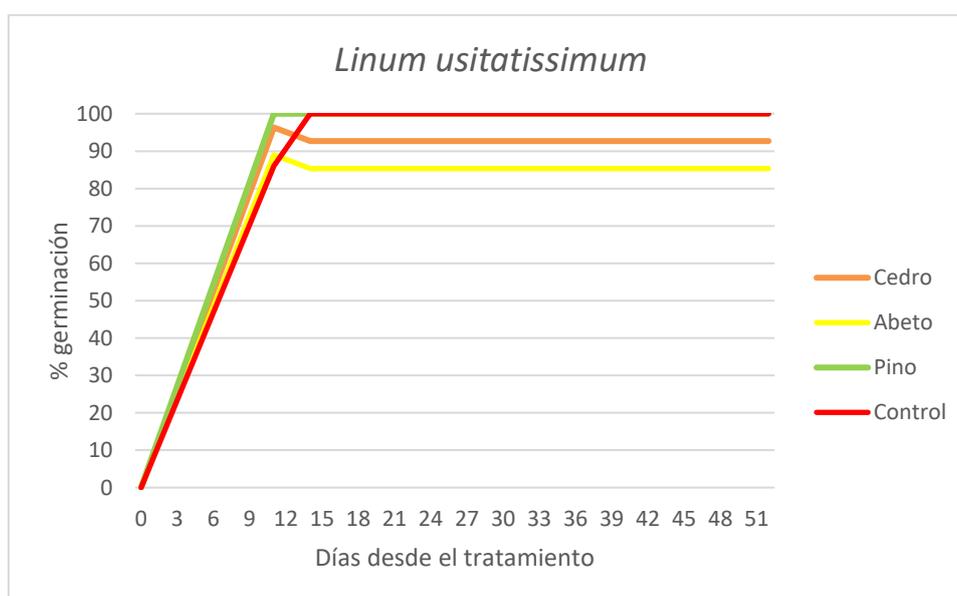
### 5.1. Ensayos de germinación de semillas en semilleros mediante riego

Tal y como se describe en el apartado IV. *Material y métodos*, los ensayos fueron realizados en semilleros, aplicando mediante riego el aceite esencial correspondiente de cedro, abeto o pino, a dosis de 2,5% y un control que no contenía aceite esencial, sólo agua corriente, repitiéndose cada combinación aceite-especie de mala hierba, tres veces.

En este apartado se van a representar los resultados obtenidos de cada combinación mediante diagramas lineales y diagramas de barras, junto con los comentarios pertinentes para su explicación y evaluación.

#### 5.1.1. Germinación de semillas de *Linum usitatissimum*

En las siguientes gráficas se representa como han actuado los diferentes aceites esenciales sobre las semillas de *Linum usitatissimum* hasta el día 52 tras el tratamiento.



**Figura 15:** Evolución diaria de la germinación de *Linum usitatissimum* en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.

En esta gráfica (Figura 15) podemos observar desde un primer vistazo un escaso control de la germinación por parte de los tres aceites esenciales; los aceites de cedro y abeto ofrecen cierta inhibición sobre la germinación de las semillas de lino, siendo mayor en el caso del abeto, que desde el día 14 se va a mantener con una tasa de germinación del 85%, correspondiente a una inhibición del 15% de la germinación de las semillas, y una inhibición del 8% en el caso del aceite de cedro, manteniendo su tasa de germinación desde el día 14 en valores del 92%. En cambio, aparentemente, el aceite

de pino lejos de inhibir la germinación va a favorecerla en los primeros días desde la siembra, observándose una germinación total en el día 11 en las semillas regadas con aceite de pino, frente a la germinación del 86% en ese mismo día en el caso del control, ambas se equilibrarán el día 14 con el 100% de las semillas germinadas, tal como se aprecia en la Figura 16. En la Figura 17 se observa el estado de las plántulas de *L. usitatissimum* en el día 52 del tratamiento con aceite esencial de pino, donde el 100% de las semillas han germinado.



**Figura 16:** Germinación de los controles de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum*, *Silene inflata*, *Lolium perenne*, *Rumex acetosella* y *Sinapis arvensis* en el día 14 de tratamiento.



**Figura 17:** Germinación de *Linum usitatissimum* y *Lolium multiflorum* en el día 52 de tratamiento por riego del aceite esencial de pino dosificado al 2,5%.

Tras el primer análisis visual realizado procedemos al análisis estadístico, realizando un análisis ANOVA para comprobar si nuestra primera hipótesis de que no se muestran diferencias significativas entre los tratamientos es real, mostrándose los resultados en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Resultados análisis ANOVA para *Linum usitatissimum*.

Día de tratamiento	Valor de P
11	0,277
14	0,219
18	0,219
21	0,314
52	0,219

En efecto, comprobamos que no hay una reducción significativa de la germinación por parte de ninguno de los tratamientos, por lo que no podemos afirmar que mediante riegos con aceites esenciales de cedro, abeto ni pino dosificados al 2,5% se produzca la inhibición de la germinación de semillas de *L. usitatissimum*. Asimismo, tampoco se encuentra un aumento significativo de la germinación en el día 11 del tratamiento de pino, por lo que no se puede afirmar que mediante riego con aceite esencial de pino dosificado al 2,5% se produzca la estimulación de la germinación de semillas de *L. usitatissimum*.

En vista de estos resultados se decide ensayar la aplicación de una segunda dosis de tratamiento mediante riego sobre los semilleros con los aceites esenciales de abeto y cedro dosificados al 2,5% para comprobar los posibles efectos que pueden tener sobre la planta ya desarrollada, los resultados se exponen más adelante, en el apartado 5.2. *Ensayos de desarrollo de plantas en semilleros con un segundo tratamiento por riego.*

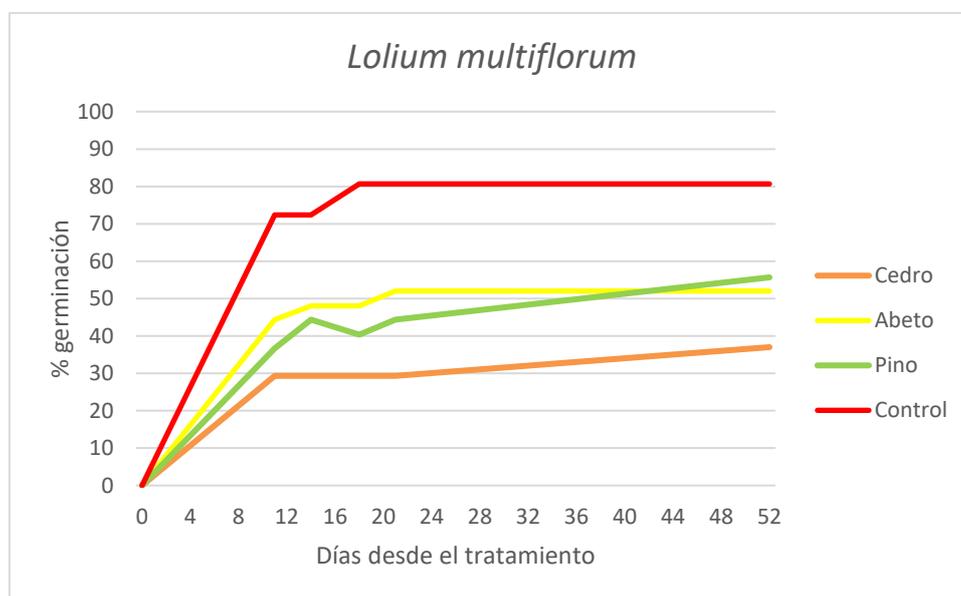
Estos aceites esenciales no han sido utilizados previamente en ensayos con *L. usitatissimum* que nos permitan conocer su efecto en otras dosis, aunque Marichali *et al.* (2014) han probado el efecto del aceite esencial de semillas de *Carum carvi* sobre semillas de lino para conocer su efecto en la germinación y crecimiento de radículas, donde no obtuvieron inhibición en la germinación de lino a concentraciones de 6,5%, mientras que el crecimiento de las radículas sí se vio reducido con todas las dosis probadas.

### 5.1.2. Germinación de semillas de *Lolium multiflorum*

A continuación, observamos el efecto de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino sobre las semillas de *Lolium multiflorum* en el tiempo transcurrido durante el ensayo.

En esta gráfica (Figura 18) observamos primeramente que la tasa de germinación más alta alcanzada por las semillas en el control no corresponde al 100%, sino que se mantiene en un 80%, alcanzada el día 18 de tratamiento, esto puede deberse a la conservación de las semillas y su actual viabilidad y va a influir a la hora del análisis de resultados de los aceites esenciales. En la Figura 16 se observa el estado de germinación del control en el día 14 de tratamiento. Aparentemente los tres aceites esenciales ejercen cierto control sobre la germinación de las semillas, en el caso del cedro se mantiene estable una germinación del 29% de las semillas hasta el día 21 de tratamiento, con una inhibición del 71% de la germinación, pero en este momento empieza a perder efecto, alcanzándose el día 52 del tratamiento la germinación del 37%. El aceite de pino tiene una evolución variable, el día 11 tiene una germinación del 37% que aumenta el día 14 alcanzando el 44% y vuelve a descender el día 18 al 40% de germinación para volver a crecer, llegando al día 52 de tratamiento con una tasa de germinación del 56%, tal como se muestra en la Figura 17, la más alta de los tres aceites a lo largo del ensayo. En el caso del abeto la germinación inicial es más alta que en los otros dos aceites, con valores del 48% de germinación entre los días 14 y 18, pero su

efecto es más estable ya que se mantiene con valores del 52% desde el día 21 hasta el final del ensayo.



**Figura 18:** Evolución diaria de la germinación de *Lolium multiflorum* en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.

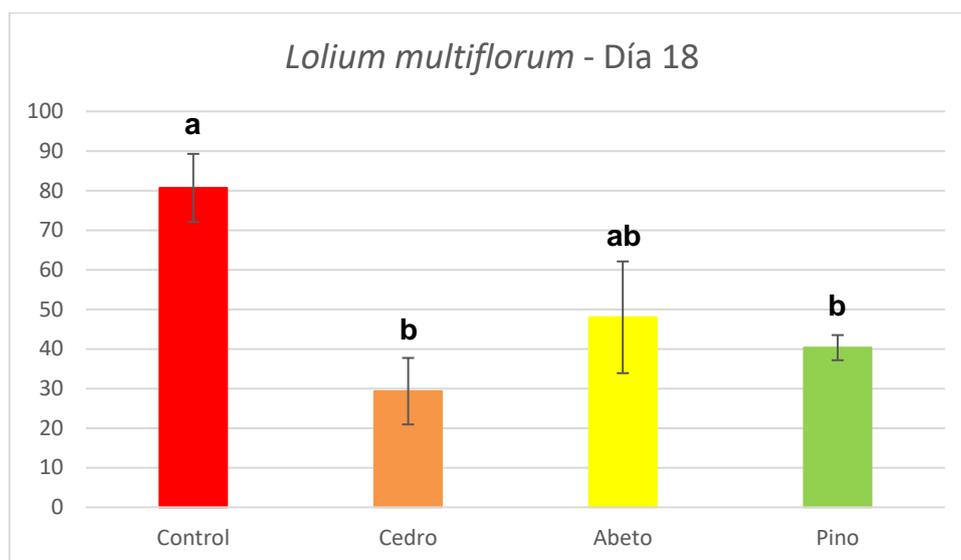
Tras este primer análisis realizamos un análisis estadístico ANOVA para comprobar las primeras hipótesis y confirmar o desmentir si los resultados observados muestran diferencias significativas, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Resultados análisis ANOVA para *Lolium multiflorum*.

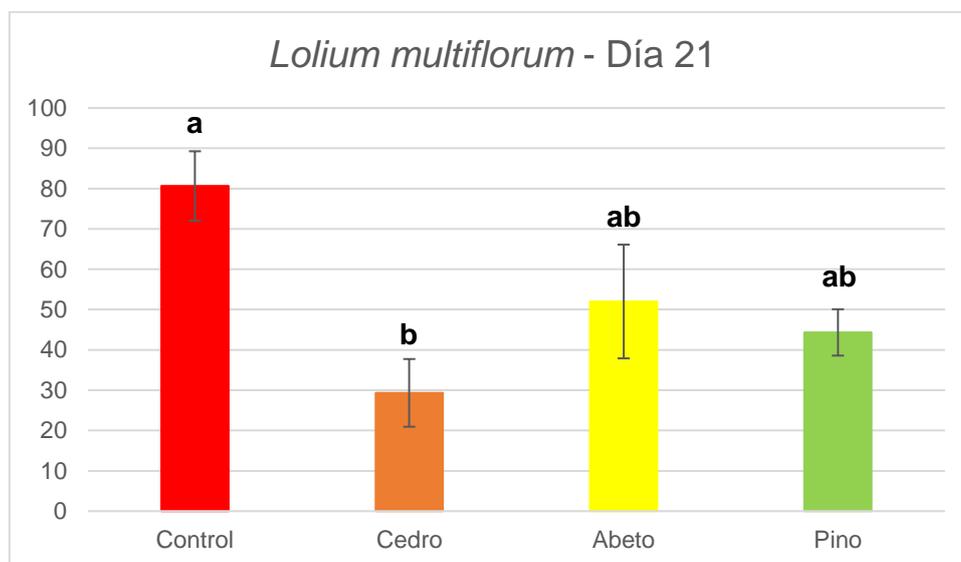
Día de tratamiento	Valor de P
11	0,103
14	0,185
18	0,040
21	0,060
52	0,237

Como observamos en la Tabla 4, encontramos valores significativamente diferentes en los días 18 y 21, lo que indica que al menos uno de los factores es diferente a los demás. Para comprobar qué factores son los significativamente diferentes en los días 18 y 21 de tratamiento empleamos el Método LSD de Fisher, cuyos resultados se muestran en las figuras 20 y 21, junto con las medias y varianzas correspondientes a cada tratamiento en los respectivos días 18 y 21.

En el día 18 de tratamiento (Figura 19) se muestran reducciones significativas en la germinación de las semillas tratadas con aceite esencial de cedro y pino frente a las semillas de control, mientras que las semillas tratadas con aceite de abeto se encuentran en una posición intermedia, no son estadísticamente diferentes del control ni de los tratamientos de cedro y pino, debido a su amplia desviación, del 28%.



**Figura 19:** Porcentaje de germinación de semillas de *Lolium multiflorum* en el día 18 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).



**Figura 20:** Porcentaje de germinación de semillas de *Lolium multiflorum* en el día 21 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

En el día 21 tras el tratamiento (Figura 20) encontramos unos valores de significación de  $P=0,06$ , que serían válidos si estableciésemos un corte menos exigente ( $p<0,1$ ) por ello analizamos las comparaciones por pares. Los resultados del tratamiento con cedro se mantienen estadísticamente diferentes del control, con una germinación del 29%, en cambio en los resultados de abeto y pino aumentan sus valores de germinación, de un

48% a un 52% y de un 40% a un 44% respectivamente y no son estadísticamente diferentes del control ni del resto de los tratamientos.

Se observa que estos aceites van perdiendo efecto con el paso de los días y en el día 52 se pierden todas las diferencias significativas, como hemos comprobado en la Tabla 4 (ANOVA), por lo que el efecto de los tratamientos ha disminuido permitiendo la germinación y el desarrollo de gran parte de las plantas. Con el fin de comprobar si mediante un segundo tratamiento podría recuperarse o superarse la inhibición del desarrollo de las plantas de *L. multiflorum* se lleva a cabo otro ensayo sobre estas poblaciones, que se muestra en el apartado 5.2. *Ensayos de desarrollo de plantas en semilleros con un segundo tratamiento por riego.*

Ibáñez y Blázquez (2019b) han comprobado el efecto *in vitro* del aceite esencial de *Pinus sylvestris* a dosis de 0,125, 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (correspondiente a 0,0125%, 0,025%, 0,05% y 0,1%) en *L. multiflorum*, donde se muestra que este aceite no causa efectos estadísticamente significativos sobre la germinación de las semillas, tan solo la dosis máxima tuvo resultados significativos sobre el desarrollo del hipocótilo, inhibiendo su desarrollo un 52% a los 14 días del tratamiento. En el mismo ensayo se prueban tratamientos con aceites esenciales de *Eucalyptus citriodora* y *Lavandula angustifolia*, obteniendo mejores resultados sobre el desarrollo del hipocótilo, con reducciones de su elongación dependientes de la dosis de aplicación, con reducciones del 80% y 87% respectivamente en la dosis más alta.

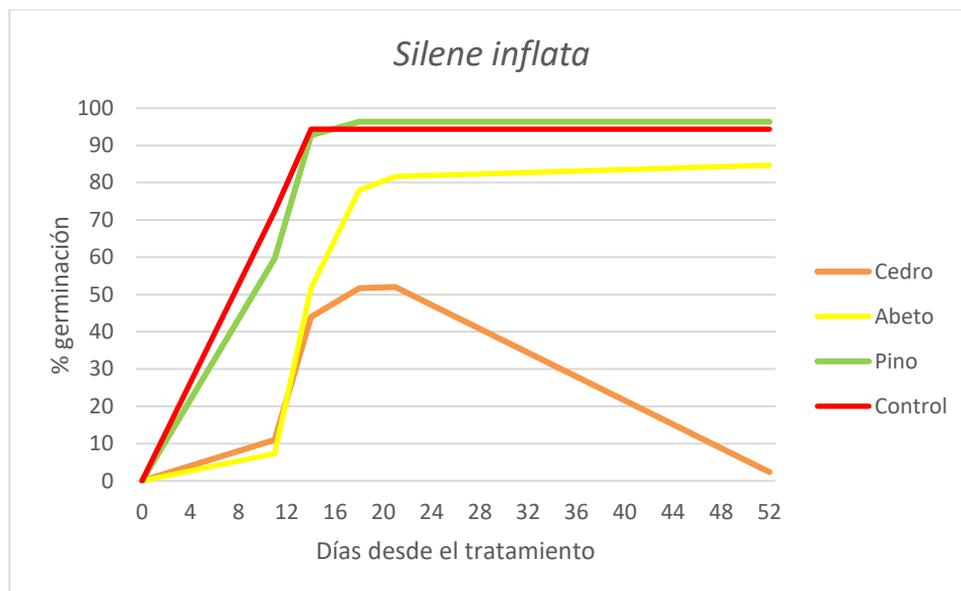
Estas mismas autoras han comprobado el efecto *in vitro* de otros aceites esenciales como *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum* (Ibáñez y Blázquez, 2018a), *Satureja montana*, *Mentha piperita*, *Pimpinella anisum* (Ibáñez y Blázquez, 2018b) *Zingiber officinale* y *Curcuma longa* (Ibáñez y Blázquez, 2019a) sobre *L. multiflorum* a dosis de 0,125, 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , obteniéndose un control total de la germinación en todas las dosis de tratamiento de *S. montana* y *M. piperita*, un control del 47% de la germinación con el tratamiento de *Z. officinale* a dosis de 1  $\mu\text{L}/\text{ml}$  y del 27% con *R. officinalis* a dosis de 1  $\mu\text{L}/\text{ml}$ . Y se han obtenido diferencias significativas frente al crecimiento del hipocótilo y el crecimiento radicular variables según la dosis en el caso de los aceites de *R. officinalis*, *O. basilicum*, *S. montana*, *M. piperita*, *Z. officinale* y *C. longa*.

Otros autores han evaluado la capacidad fitotóxica *in vitro* de aceites esenciales frente a la germinación y crecimiento radicular inicial de *Lolium multiflorum*. Smeriglio *et al.* (2019) han utilizado aceites esenciales de *Z. officinale*, *Pistacia vera*, *Cannabis sativa* y *Cupressus sempervirens* con dosis de 0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o ppm, donde tan solo *Z. officinale* ha sido capaz de controlar el crecimiento radicular de *L. multiflorum* con su dosis máxima.

En vista de estos datos los aceites esenciales de abeto y pino, aunque presentan cierta capacidad fitotóxica sobre la especie *L. multiflorum*, no se muestran como herramientas idóneas para su control biológico, existiendo otras alternativas más prometedoras que necesitan menores dosis. En el caso del cedro sería interesante realizar nuevos ensayos con diferentes dosis y comprobar si se mantienen los efectos inhibitorios de la germinación de *L. multiflorum* en dosis más viables fuera del laboratorio.

### 5.1.3. Germinación de semillas de *Silene inflata*

En las siguientes gráficas se muestra el efecto de los aceites esenciales sobre la capacidad germinativa de las semillas de *Silene inflata* hasta el día 52 de tratamiento.



**Figura 21:** Evolución diaria de la germinación de *Silene inflata* en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.

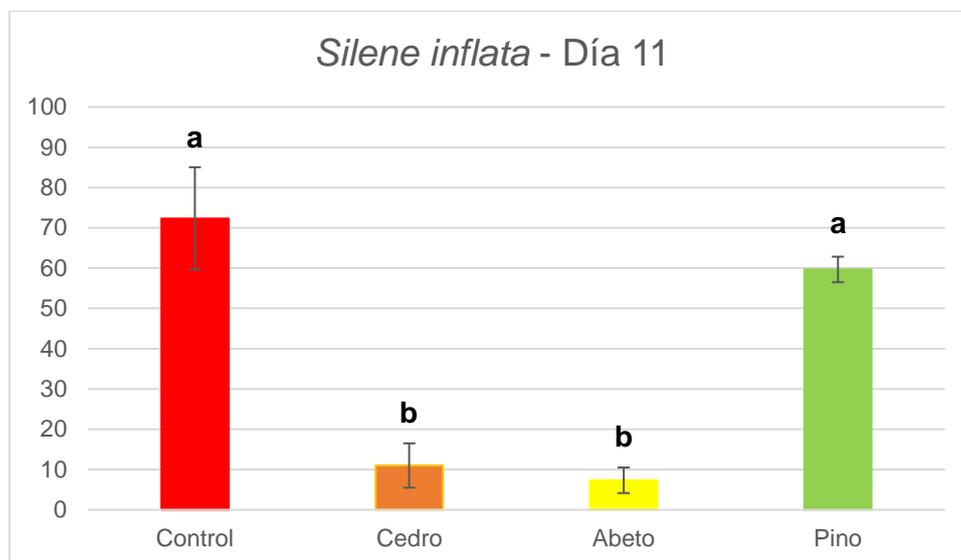
En la gráfica (Figura 21), observamos que en este caso la germinación de las semillas del control ha sido casi total, de un 94% desde el día 14 de tratamiento, momento mostrado en la Figura 16, hasta el final del ensayo, muy similar a los resultados con aceite esencial de pino, que incluso lo supera con valores del 96% de germinación desde el día 18 hasta el 52 de tratamiento, por lo que podemos determinar de forma inicial que el aceite de pino no tiene capacidad de inhibición de la germinación de la especie *S. inflata*. En el caso del aceite de abeto se observa un gran control de la germinación en el día 11, con valores del 7%, este efecto se reduce considerablemente el día 14, alcanzando una tasa de germinación del 52%, que va aumentando hasta alcanzar valores del 85% de semillas germinadas el día 52 de tratamiento. Por otro lado, el aceite esencial de cedro tiene un inicio similar al de abeto, con una germinación del 11% el día 11, que va a aumentar rápidamente al día 14 con un 44% de germinación, y sigue subiendo, ahora más despacio, hasta alcanzar la máxima germinación el día 21 con valores del 52%, pero después va a descender de forma notable hasta llegar al día 52 de tratamiento, donde solo quedará un 3% de las plantas activas, entre las que no llegaron a germinar y las que se han visto afectadas tras su germinación, este tratamiento habrá permitido la inhibición del desarrollo del 97% de las semillas.

Para comprobar las primeras hipótesis deducidas de este primer análisis de datos, realizamos un análisis estadístico ANOVA y confirmar o desmentir si los resultados observados muestran diferencias significativas, tal como se expone en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Resultados análisis ANOVA para *Silene inflata*.

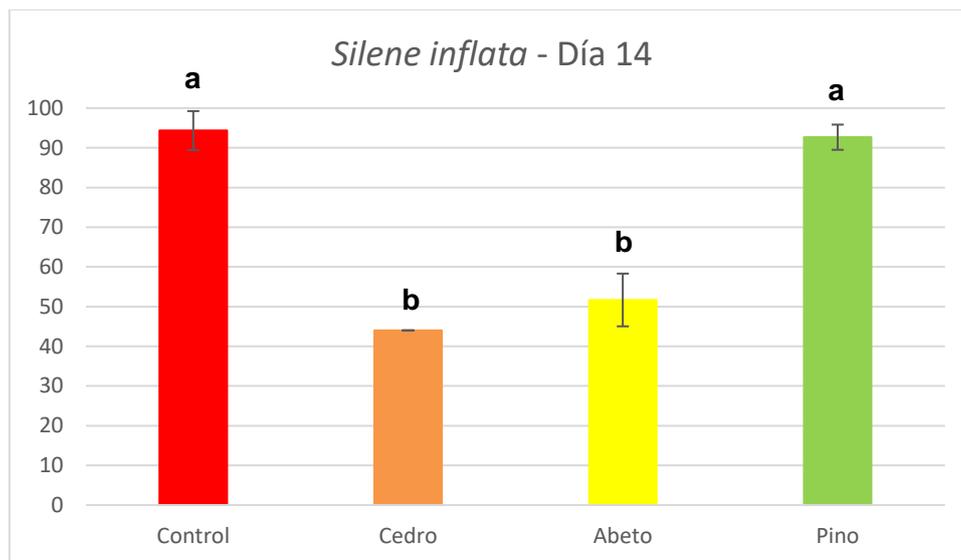
Día de tratamiento	Valor de P
11	0,001
14	0,000
18	0,016
21	0,004
52	0,000

En efecto, la Tabla 5 nos muestra que en todos los días de observación se producen diferencias significativas en el ANOVA. Para comprobar qué factores son los significativamente diferentes en cada día de tratamiento empleamos el Método LSD de Fisher. Los resultados del Método Fisher junto con las medias y desviaciones correspondientes a cada tratamiento se muestran en las Figuras 22 a 26 (días 11, 14, 18, 21 y 52).



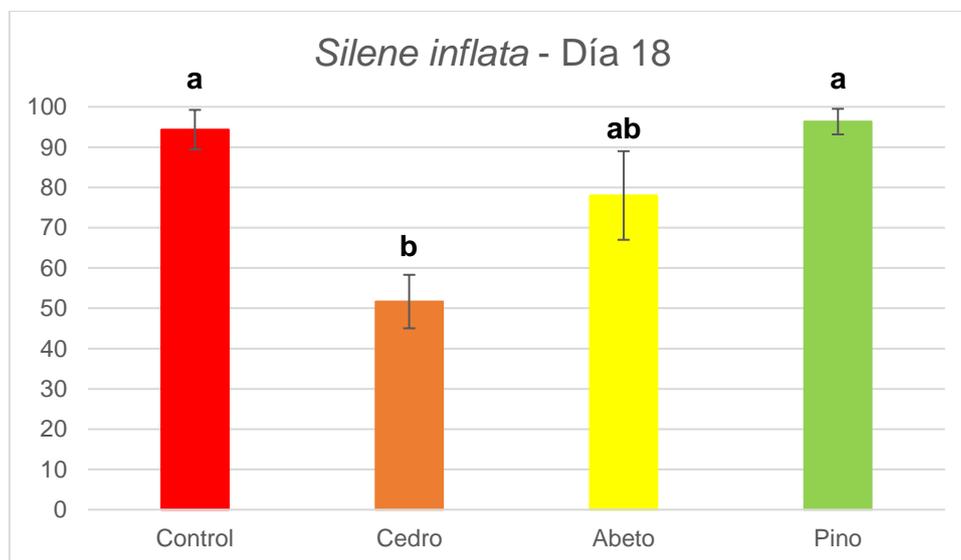
**Figura 22:** Porcentaje de germinación de semillas de *Silene inflata* en el día 11 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

En el día 11 de tratamiento (Figura 22) se cumple lo esperado, los tratamientos de cedro y abeto son estadísticamente inferiores al control y al tratamiento de pino que es estadísticamente similar al control, con valores de germinación casi 7 veces inferiores al control en el caso del cedro y 10 veces inferiores en el caso del abeto. El gran valor de desviación presente en el control, del 25%, influye a que los resultados del tratamiento de pino sean tomados como similares a los del control.



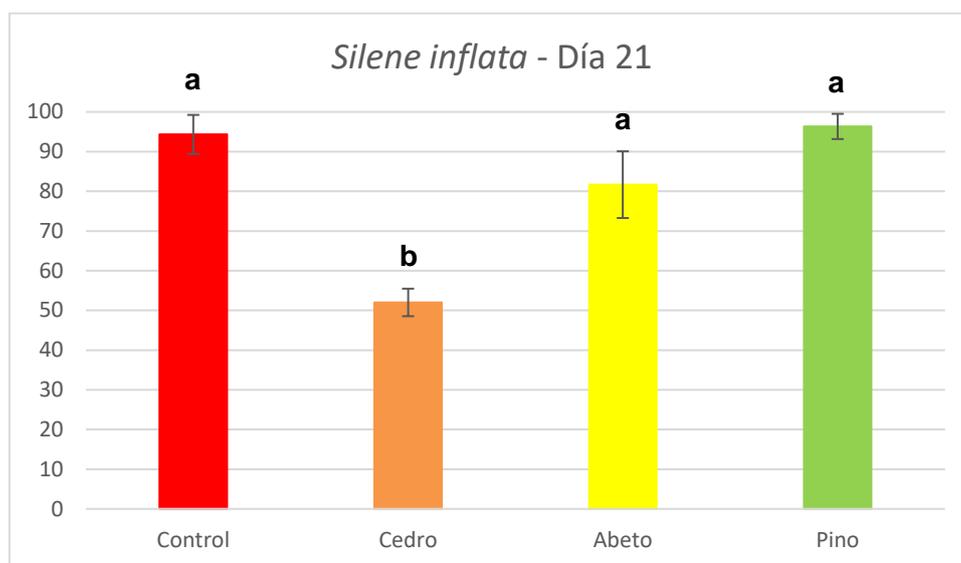
**Figura 23:** Porcentaje de germinación de semillas de *Silene inflata* en el día 14 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

En el día 14 de tratamiento (Tabla 23) se mantienen las diferencias significativas de Fisher, distinguiéndose las poblaciones de control y pino frente a las de cedro y abeto que mantienen valores estadísticamente inferiores. En este caso los valores de germinación de todos los grupos han aumentado, llegando al máximo en el caso del control y reduciéndose su desviación al 10%.



**Figura 24:** Porcentaje de germinación de semillas de *Silene inflata* en el día 18 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

En el día 18 de tratamiento (Figura 24) ya observamos deferencias en los resultados del Método de Fisher, donde el abeto aumenta su tasa de germinación, con valores del 78% y se coloca en una posición intermedia entre los grupos significativamente diferentes de control y pino frente al grupo del cedro. Se aprecia que el tratamiento de cedro también aumenta su tasa de germinación, llegando al 52% pero aun manteniéndose con valores significativamente diferentes al control; y el tratamiento de pino alcanza su valor más alto de germinación, como ya se observaba en la Figura 21 quedando un poco por encima de la germinación del control (96%).

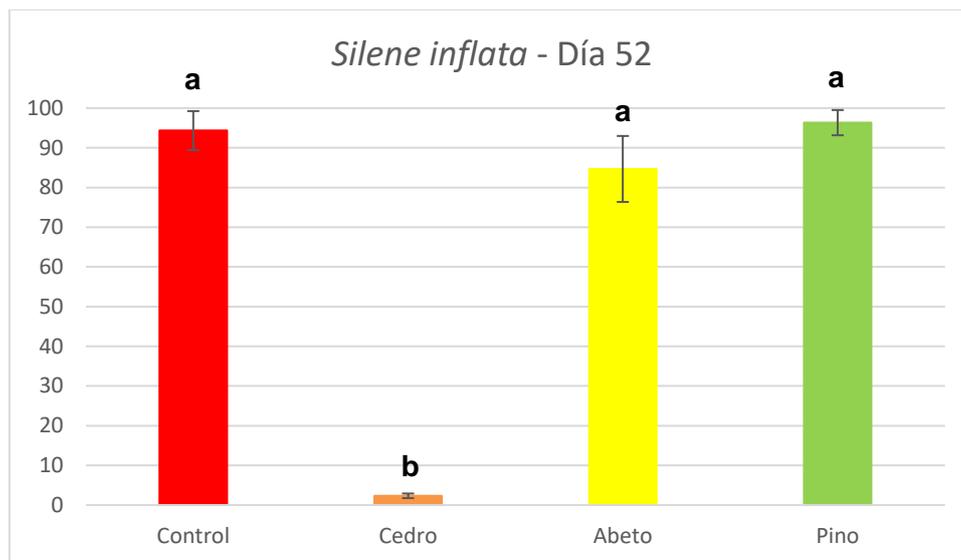


**Figura 25:** Porcentaje de germinación de semillas de *Silene inflata* en el día 21 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

En el día 21 de tratamiento (Figura 25) el control y los tratamientos de abeto y pino son estadísticamente similares al control y el tratamiento de cedro mantiene sus valores y diferencias significativas.

En el día 52 de tratamiento (Figura 26) las plantas tratadas con aceite de cedro han ido muriendo hasta llegar a unos valores de tan solo el 2% de supervivencia, lo que puede determinar el modo de acción del aceite esencial de cedro sobre la especie de *S. inflata*, siendo capaz de retrasar parcialmente su germinación para después provocar su muerte o pérdida de vigor una vez ha germinado la planta.

Para seguir observando la respuesta de los aceites de abeto y cedro mediante un segundo tratamiento se ha llevado a cabo otro ensayo que se muestra en el apartado 5.2. *Ensayos de desarrollo de plantas en semilleros con un segundo tratamiento por riego.*



**Figura 26:** Porcentaje de germinación de semillas de *Silene inflata* en el día 52 desde el tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino. Las barras de error muestran la desviación media. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

No hay constancia de ensayos de aceites esenciales sobre *Silene vulgaris*, aunque sí se ha comprobado la fitotoxicidad del extracto acuoso de hojas de *Citrus ladanifer*, una especie de la familia Cistaceae, sobre semillas de *Silene tridentata*, obteniendo la inhibición de estas semillas con la aplicación del extracto acuoso tanto fresco como caliente a dosis de 100 y 50 g/L (Herranz *et al.*, 2006). Otras especies de la misma familia Caryophyllaceae que *S. inflata*, se han ensayado, como es el caso de *Stellaria media*, donde se ha comprobado la capacidad del extracto seco de hojas de *Cynara cardunculus* para inhibir su capacidad germinativa *in vitro* en placas de Petri, obteniéndose resultados inhibitorios en tratamientos con extractos de hojas secas y hojas liofilizadas de *C. cardunculus* (Scavo *et al.*, 2020).

En vista de los buenos resultados obtenidos con el aceite esencial de cedro en este ensayo y la falta de trabajos previos al respecto sería de gran interés seguir investigando los efectos de este aceite esencial, haciendo pruebas a menores dosis para así poder ajustar su posible uso como bio-herbicida a escala real. En cambio, los aceites esenciales de abeto y pino, a pesar de un cierto control inicial de la germinación por parte del aceite de abeto que luego se ha perdido, no se presentan como herramientas útiles para el control biológico de *S. inflata*.

#### 5.1.4. Germinaciones fallidas

En este apartado se exponen los resultados obtenidos de las pruebas con *Rumex acetosella*, *Sinapis arvensis* y *Lolium perenne*, cuyos resultados han sido descartados del ensayo.

##### 5.1.4.1. Especies no germinadas

Las especies *Rumex acetosella* y *Sinapis arvensis* no han germinado en los semilleros, ni en el control ni en los tratamientos, por lo que se descartan sus resultados en el ensayo. En la Figura 16 aparecen las germinaciones nulas de los controles de *R.*

*acetosella* y *S. arvensis* en el día 14 desde el tratamiento. No se conoce la causa exacta por la que no han sido capaces de germinar, aunque lo más probable es que el periodo de conservación haya sido demasiado largo para estas especies que presentaron buena germinación en 2014 (Reol, 2014). Los resultados de las germinaciones de estas semillas se muestran en las Figuras 26 y 27.

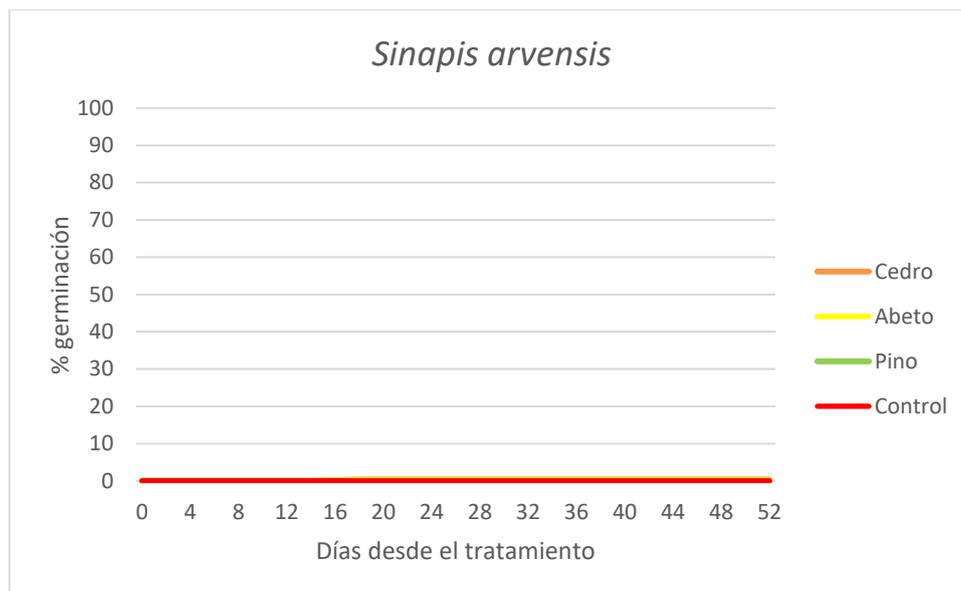


**Figura 27:** Evolución diaria de la germinación de *Rumex acetosella* en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.

En la Figura 27 se muestra la gráfica de germinación de *R. acetosella*, donde los aceites de abeto y pino coinciden con los valores del control, todos con una tasa de germinación del 0% en todos los días de tratamiento. De forma extraña, en las semillas tratadas con cedro sí ha habido una germinación del 3%, correspondiente a una semilla de las 3 repeticiones, que aparentemente puede deberse a que esta semilla ha sobrevivido a los factores que han impedido la germinación del resto de la colección. Sería necesario repetir la prueba con semilla nueva para poder llegar a alguna conclusión.

No se encuentra bibliografía donde se haya empleado alguno de los aceites de cedro, abeto o pino para conocer su efecto fitotóxico sobre *R. acetosella*, aunque sí aparecen trabajos previos donde se han empleado los aceites volátiles crudos de *Eucalyptus camaldulensis* sobre estas semillas, disminuyendo su crecimiento (Zhang *et al.*, 2010); o el aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre *Rumex nepalensis*, capaz de inhibir totalmente su germinación en concentraciones del 0,06% (Setia *et al.*, 2007).

En el caso de *S. arvensis* no hay ninguna duda, tal como se observa en la Figura 28, ninguna de las semillas ha germinado en ninguno de los casos de tratamiento ni de control, por causa que desconocemos pero que nos obliga a rechazar esta especie del ensayo.



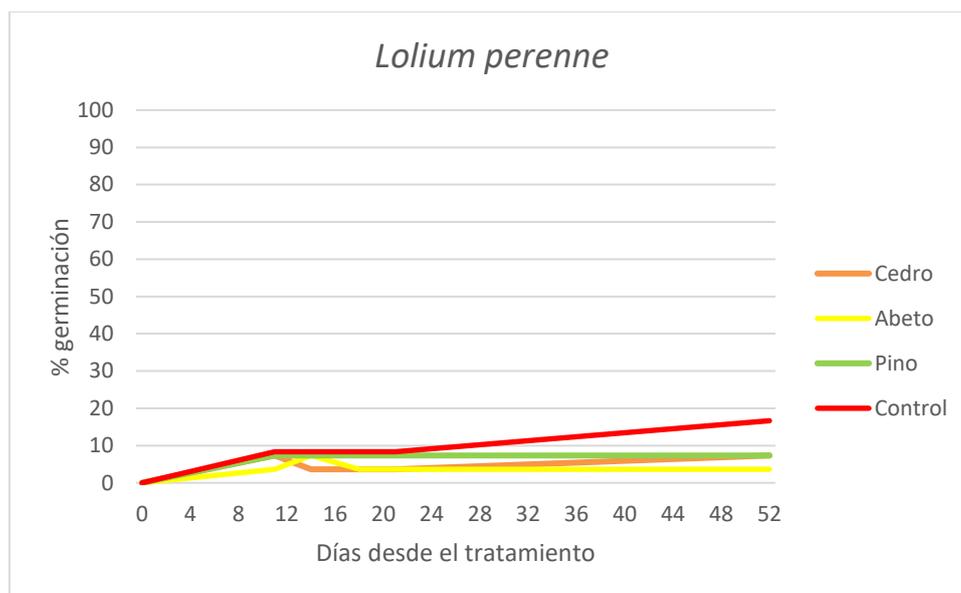
**Figura 28:** Evolución diaria de la germinación de *Sinapis arvensis* en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.

En trabajos previos se ha probado el efecto de aceites esenciales de pino sobre la germinación de semillas de *S. arvensis* ensayado *in vitro* en placas de Petri. Como el aceite esencial de *Pinus nigra*, que ha inhibido totalmente la germinación de *S. arvensis* en dosis de 0,4 y 0,5% y con resultados significativos en la inhibición de germinación y de crecimiento del hipocótilo en el resto de dosis probadas de 0,1%, 0,2% y 0,3% (Amri *et al.*, 2017), el aceite esencial de *Pinus halepensis*, con inhibición total de la germinación de *S. arvensis* con dosis de 0,2% del aceite esencial y con inhibiciones significativas de la germinación y crecimiento en el resto de dosis: al 0,1% solo germinaron el 14% de las semillas y al 0,05% germinaron el 40% de las semillas (Amri *et al.*, 2013), o el aceite esencial de *Pinus pinea*, responsable de la inhibición total de la germinación de *S. arvensis* con dosis del 0,2% del aceite esencial y con reducciones significativas de la germinación con el resto de dosis: germinación del 27% al 0,1% de aceite esencial y del 55% al 0,05% de aceite (Amri *et al.*, 2012).

El efecto de los aceites de cedro y abeto no ha sido estudiado en otros ensayos, por ello y en vista de los resultados obtenidos con otras especies de pino sería de interés llevar a cabo esta prueba con material vegetal nuevo y poder conocer sus resultados.

#### 5.1.4.2. *Lolium perenne*

Las semillas de *Lolium perenne* han tenido una escasa germinación, tal como se muestra en la siguiente figura, pero mayor que en el caso de las otras dos especies eliminadas del ensayo.



**Figura 29:** Evolución diaria de la germinación de *Lolium perenne* en semillero frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%.

Como muestra la gráfica (Figura 29), algunas de las semillas de *L. perenne* han germinado, como se aprecia en la Figura 16, pero con valores inferiores al 20% en el control, e inferiores al 10% en los tratamientos, por lo que estos resultados no nos van a permitir llegar a ninguna conclusión sobre su efecto sobre la germinación de esta especie. En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis estadístico ANOVA para comprobar si los valores obtenidos tienen significación estadística.

**Tabla 6:** Resultados análisis ANOVA para *Lolium perenne*.

Día de tratamiento	Valor de P
11	0,924
14	0,924
18	0,924
21	0,924
52	0,395

Los resultados del ANOVA obtenidos que expuestos en la Tabla 6 indican que no se encuentra significación estadística, lo que muestra que los resultados del control y de los tratamientos son similares. Al tener valores de germinación tan bajos en el control no podemos saber si esta falta de significación se debe a que los tratamientos no tienen efecto sobre *L. perenne* o a que la escasa viabilidad de las semillas impide llegar a alguna conclusión.

Los aceites esenciales de las especies de cedro, abeto y pino objeto de evaluación no han sido empleadas previamente en ensayos con *L. perenne*, aunque otra especie de pino, *Pinus taeda*, sí ha sido empleada y se ha comprobado el efecto inhibitorio del aceite esencial de sus hojas sobre el crecimiento radicular de *L. perenne* (Kennedy *et al.*, 2011).

Otros aceites esenciales procedentes de familias diferentes a la *Pinaceae* han mostrado resultados inhibitorios sobre *L. perenne*, como el aceite esencial de rizoma de *Acorus calamus*, capaz de inhibir su germinación con dosis de 737 µg/ml o ppm (Satyal *et al.*,

2013); el aceite esencial de semilla de *Amomum subulatum*, inhibidor de la germinación a 1674 µg/ml o ppm (Satyal *et al.*, 2012), los aceites de *Zataria multiflora* con dosis de 2%, *Carum copticum* al 3% y *Rosmarinus officinalis* al 2%, capaces de inhibir tanto la germinación como el crecimiento radicular de *L. perenne* (Saharkhiz *et al.*, 2009), los aceites esenciales de tallo, hojas y flores de *Eupatorium maculatum* a la dosis de 0,5 mg/ml, capaces de inhibir la germinación y el crecimiento radicular de *L. perenne* (Wang *et al.*, 2020), o aceites esenciales de pimienta, con inhibición del crecimiento de raíces y hojas de *L. perenne* con aceite esencial de *Pipiper dilatatum* a 0,2 mg/ml y de *Pipiper divaricatum* a 0,1 mg/ml (Jaramillo-Colorado *et al.*, 2019).

En vista de los resultados obtenidos en los trabajos previos consultados en los que se utilizan dosis similares a las planteadas en este ensayo, resultaría interesante la repetición de entre trabajo a la dosis de 2,5% para un primer control del efecto de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino sobre la especie de *L. perenne*, y en caso de obtener resultados de fitotoxicidad sobre esta especie, repetirlo con dosis menores para comprobar la viabilidad de estos aceites como agentes de control.

## 5.2. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros con un segundo tratamiento por riego

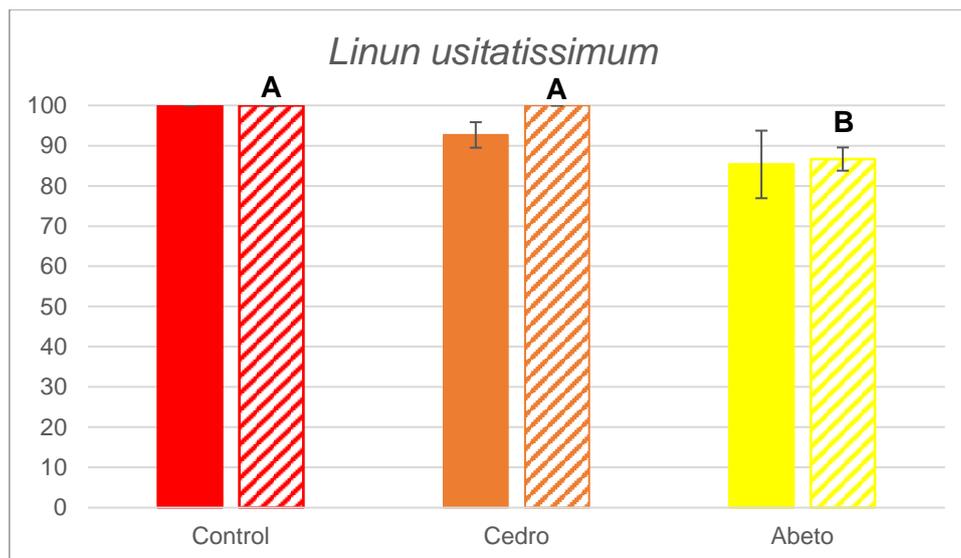
Como se describe en el apartado IV. Material y métodos, los ensayos se han realizado en los semilleros de las especies de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Silene inflata* que presentaron buena germinación. Se ha aplicado mediante riego una segunda dosis del aceite esencial correspondiente de cedro (naranja) o abeto (amarillo) a dosis de 2,5% y un control (rojo) que no contenía aceite esencial, sólo agua corriente, repitiéndose cada combinación aceite-especie de mala hierba tres veces.

Se ha realizado una única toma de resultados a los 15 días del segundo tratamiento, en este apartado se van a representar los resultados obtenidos de cada combinación mediante los gráficos y comentarios pertinentes para su explicación y evaluación. Con el objetivo de valorar la efectividad del segundo tratamiento se realiza el análisis estadístico correspondiente y después se va a comparar con el efecto obtenido con una sola dosis (a los 14 días).

En el registro bibliográfico hasta la fecha, se ha probado la repetición de tratamientos con aceite de pino sin éxito, no siendo capaz de controlar los rebrotes de nuevas hierbas y, aunque no hay publicados ensayos con dobles tratamientos de otros aceites esenciales como el cedro o el abeto, sí se conocen productos no sintéticos como el ácido acético capaces de mejorar su efecto herbicida con la repetición del tratamiento de forma más viable económica y medioambientalmente que la aplicación de un tratamiento con glifosato (Young, 2004).

### 5.2.1. Supervivencia de plantas de *Linum usitatissimum*

A continuación, se representa el efecto de los aceites esenciales de cedro y abeto sobre las plantas de *Linum usitatissimum* en el día 14 de la aplicación de la primera dosis de tratamiento mediante riego, en color sólido, y en el día 15 de la aplicación de la segunda dosis de tratamiento mediante riego, a rayas.



**Figura 30:** Porcentaje de supervivencia de *Linum usitatissimum* con una dosis (color sólido) y con dos dosis (a rayas) de tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro y abeto. Las barras de error muestran la desviación media. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

En la Figura 30 se observan resultados muy similares entre los casos de tratamiento único y de doble tratamiento. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico encontramos que aparecen diferencias significativas ( $P > 0,04$ ) con el control para el tratamiento de aceite de abeto que no aparecían con una sola dosis. Esto es debido a la menor variabilidad de los datos a pesar de que los valores de las medias muestran valores prácticamente idénticos.

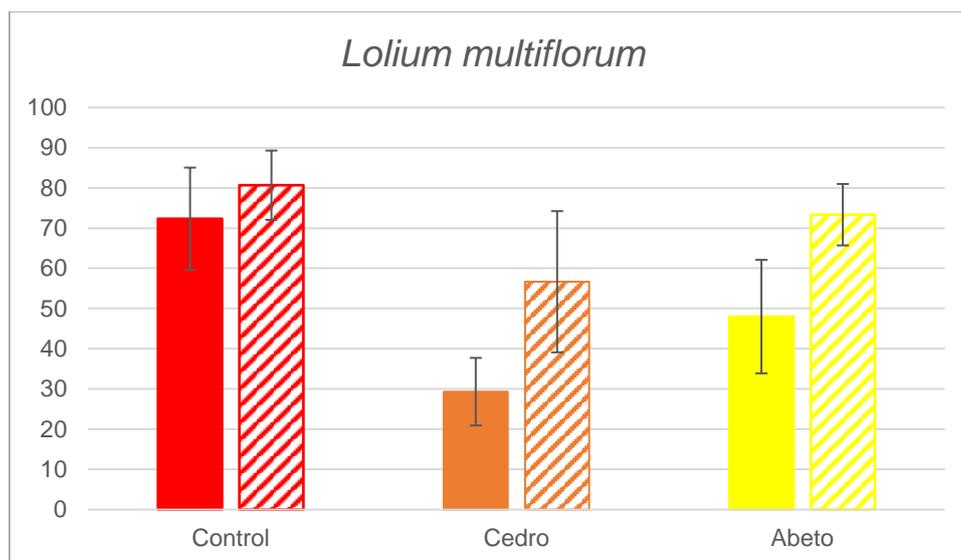
Al comparar los resultados entre uno y dos tratamientos no se encuentran diferencias significativas entre ninguno de ellos y la supervivencia de las plantas con tratamiento o doble de aceite de abeto alcanza casi el 90%.

En vista de estos resultados no resulta interesante una segunda aplicación del tratamiento con aceite esencial de cedro ni de abeto, al menos en la dosis estudiada, ya que no proporciona un mayor control de *L. usitatissimum* que el que produce la aplicación única del tratamiento.

### 5.2.2. Supervivencia de plantas de *Lolium multiflorum*

El efecto de los aceites esenciales de cedro y abeto sobre las plantas de *Lolium multiflorum* en el día 14 de la aplicación de la primera dosis y en el día 15 de la aplicación de la segunda dosis se muestra a continuación.

En la Figura 31 se puede apreciar que el segundo tratamiento con los aceites esenciales no ha permitido el control del desarrollo de la especie de *L. multiflorum*, ni tampoco ha intensificado el efecto del primer tratamiento, ya que en ambos casos tras la segunda dosis las plantas han ido recuperándose, aumentando de un 29 a un 57% en el caso del cedro, y de un 48 a un 73% la cantidad de plantas sanas en el caso del abeto.



**Figura 31:** Porcentaje de supervivencia de *Lolium multiflorum* con una dosis (color sólido) y con dos dosis (a rayas) de tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro y abeto. Las barras de error muestran la desviación media.

Los resultados del ANOVA no muestran diferencias significativas con el control en tratamiento único ( $P=0,185$ ) ni con tratamiento doble ( $P=0,503$ ).

Comparando tratamiento único y doble observamos que solamente el aceite de cedro podría tener un efecto en dosis única aparentemente (aunque estadísticamente no es válido por la variabilidad de los datos).

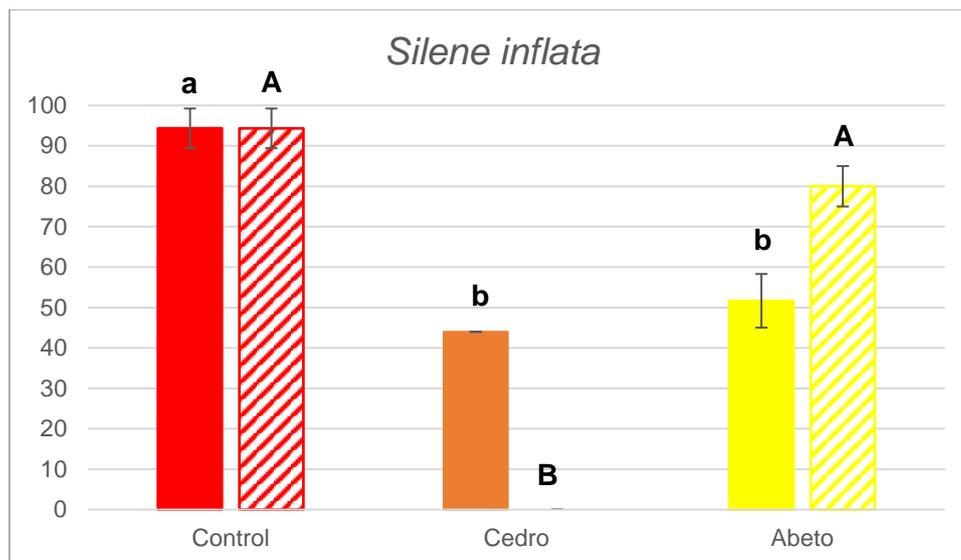
En vista de estos resultados, no se encuentran diferencias significativas entre la aplicación de un único tratamiento y la aplicación de un tratamiento doble para ninguno de los dos casos, por lo que no podemos afirmar que un segundo tratamiento mediante riego con aceite esencial de cedro ni de abeto dosificado al 2,5% sea capaz de inhibir el desarrollo de las plantas de *L. multiflorum*.

No se plantea como una opción viable realizar una segunda aplicación del tratamiento con aceite esencial de cedro ni de abeto en la dosis estudiada, ya que no proporciona mayor control que la aplicación única del tratamiento sobre las plantas de *L. multiflorum*.

### 5.2.3. Supervivencia de plantas de *Silene inflata*

En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos en el día 14 de la aplicación de la primera dosis y en el día 15 de la aplicación de la segunda dosis de los aceites esenciales de cedro y abeto mediante riego en plantas desarrolladas de *Silene inflata*.

En este caso, tal como observamos en la Figura 32, la segunda aplicación del aceite esencial de cedro sí parece mostrar un efecto inhibitor sobre el desarrollo de las plantas de *S. inflata*, reduciendo el porcentaje de las que han sobrevivido pasando del 44% de supervivientes a que no quede ninguna, mientras que en el caso del aceite de abeto las plantas supervivientes se recuperan del 51% al 80% y la reducción deja de ser estadísticamente significativa.



**Figura 32:** Porcentaje de supervivencia de *Silene inflata* con una dosis (color sólido) y con dos dosis (a rayas) de tratamiento al 2,5% de los aceites esenciales de cedro y abeto. Las barras de error muestran la desviación media. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados del ANOVA muestran diferencias significativas con el control en tratamiento único ( $P=0,000$ ) y con tratamiento doble ( $P=0,000$ ). Solo el aceite esencial de cedro nos permite afirmar que un segundo tratamiento mediante riego con aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% es capaz de inhibir el desarrollo de las plantas de *S. inflata*. En cambio, en el caso del abeto, las diferencias significativas que encontrábamos en el día 14 desaparecen a los pocos días (mediciones de días 18 y siguientes, expuestas en las Figuras 19 a 21), y un segundo tratamiento no aporta ningún efecto adicional presentando valores similares con supervivencia en torno al 80%.

En vista de los resultados obtenidos, la aplicación de un segundo tratamiento con aceite esencial de cedro se presenta como una opción viable para el control de la especie arvense *S. inflata*, donde sería interesante el estudio de su efecto con dosis menores que sean más interesantes económicamente e incluso comprobar qué periodos de tiempo entre el primer y el segundo tratamiento sería óptimos.

### 5.3. Ensayos de supervivencia de plantas en semilleros mediante pulverización

Como se describe en el apartado IV. *Material y métodos*, se ha realizado un ensayo sobre plantas adultas de las especies *Lolium multiflorum*, *Silene inflata* y *Nicotiana tabacum*, sobre las que se ha pulverizado aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% en las tres especies, y, además, en el caso de *N. tabacum* se ha realizado un ensayo adicional, pulverizando el aceite esencial de cedro a dosis del 1 y del 0,5%.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a los 5 días del tratamiento: Primeramente, se comparan los resultados de las tres especies tratados con dosis única del 2,5% y después se expondrán los resultados de *N. tabacum* a las diferentes dosis. Todos los datos se mostrarán mediante las gráficas y explicaciones oportunas.

### 5.3.1. Supervivencia vegetal al aceite esencial de cedro

Tras la toma de muestras realizada a los 5 días del tratamiento mediante pulverización de aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% sobre las especies de *Lolium multiflorum*, *Silene inflata* y *Nicotiana tabacum* se obtienen los resultados que se exponen en la siguiente tabla (Tabla 7).

**Tabla 7:** Porcentaje de superficie foliar superviviente de *Lolium multiflorum*, *Silene inflata* y *Nicotiana tabacum* en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5%.

Especie	Control	Tratamiento
<i>Lolium multiflorum</i>	100	50
<i>Silene inflata</i>	100	0
<i>Nicotiana tabacum</i>	100	0

Como se observa en la Tabla 7, el tratamiento por pulverización ha ejercido un control parcial sobre el follaje de *L. multiflorum* y controles totales sobre el follaje de *S. inflata* y *N. tabacum*, tal como se aprecia en las Figuras 33, 34 y 35. La superficie foliar de las dos especies de hoja ancha ha sido totalmente quemada tras el contacto con el aceite esencial, mientras que en la especie de hoja estrecha observamos hojas que han sido quemadas y otras en las que no se aprecia efecto, cabe esperar que por la morfología de las hojas de *L. multiflorum*, el aceite esencial pulverizado haya podido resbalar de estas, evitando su efecto. Estudios demuestran que el uso de coadyuvantes puede aumentar la eficacia de los tratamientos (Davarynejad, 2001), en base a esto, se podría repetir el ensayo añadiendo algún coadyuvante, como un mojante, para tratar de aumentar el contacto del aceite con las hojas de *L. multiflorum*.

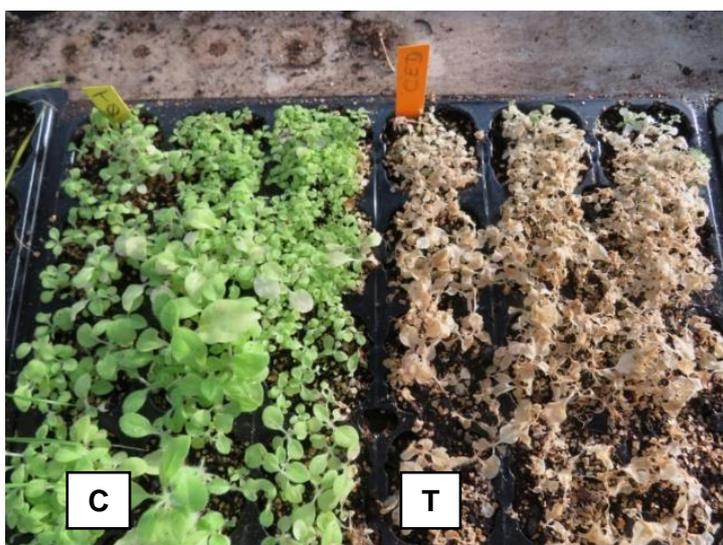
Se ha realizado la prueba Chi cuadrado con cada especie, obteniéndose en los tres casos valores de probabilidad menores a 0,001, lo que indica significación en los resultados del tratamiento para las tres especies, por lo que podemos afirmar que la aplicación por pulverización del aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% es capaz de suprimir el desarrollo foliar.



**Figura 33:** Superficie foliar de *Lolium multiflorum* en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% (T) y control (C).



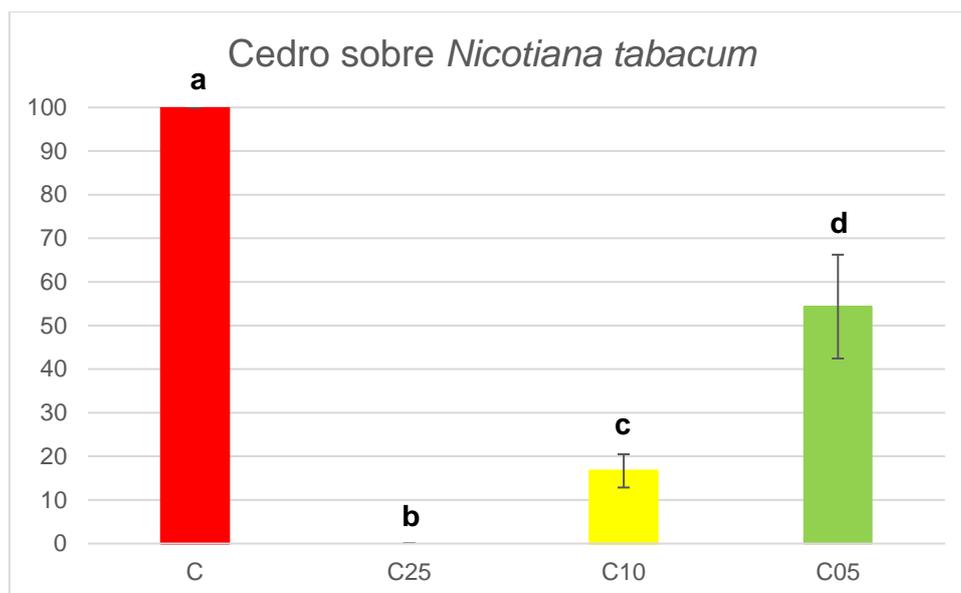
**Figura 34:** Superficie foliar de *Silene inflata* en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% (T) y control (C).



**Figura 35:** Superficie foliar de *Nicotiana tabacum* en el día 5 de tratamiento por pulverización de aceite esencial de cedro al 2,5% (T) y control (C).

### 5.3.2. Supervivencia de *Nicotiana tabacum* al aceite esencial de cedro

Los resultados de la toma de muestras realizada a los 5 días del tratamiento mediante pulverización de aceite esencial de cedro a dosis variable sobre la especie de *Nicotiana tabacum* se exponen en la siguiente figura (Figura 36).



**Figura 36:** Porcentaje foliar de *Nicotiana tabacum* superviviente al tratamiento de aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% (C25), 1% (C10) y 0,5% (C05). Las barras de error muestran la desviación estándar. Las columnas que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Método LSD de Fisher).

La Figura 36 nos muestra los daños producidos por el aceite de cedro sobre el follaje de *N. tabacum*. La supervivencia del cultivo ha sido mayor al reducir la dosis de tratamiento, del 0% de supervivencia con el tratamiento de cedro al 2,5% (tal como se ha mostrado en la Figura 35), al 17% y 54% de supervivencia con los tratamientos del 1% y 0,5% de aceite, respectivamente.

Se ha realizado un análisis ANOVA sobre los valores obtenidos, con un resultado de  $P < 0,001$ , lo que determina diferencias significativas entre los resultados de las diferentes dosis y el control. El método LSD de Fisher ha permitido determinar que todas las muestras son diferentes entre sí, de esta manera se demuestra que con las tres dosis aplicadas se obtienen resultados significativamente diferentes a los del control. Así se demuestra la fitotoxicidad del aceite esencial de cedro sobre plantas de *N. tabacum* ya que su aplicación mediante pulverización en dosis del 2,5%, 1% y 0,05% es capaz de impedir la supervivencia del follaje de esta especie.

El aceite esencial de cedro ha sido mayoritariamente estudiado por sus capacidades antioxidantes, antiinflamatorias, analgésicas, fungicidas y larvicidas, pero no tanto por su potencial como herbicida, pero otros aceites esenciales sí han sido estudiados por su efecto fitotóxico en aplicación por pulverización sobre el follaje de especies de malas hierbas. Benvenuti *et al.*, (2017) han realizado un ensayo con aceites esenciales procedentes de plantas de la familia *Asteraceae* para comprobar su efectividad como herbicidas naturales sobre *Amaranthus retroflexus* y *Setaria viridis*, con resultados de control positivos mediante pulverización sobre el follaje en dosis de 100 mg/L o ppm cuando se han aplicado en el estado de dos cotiledones, y de 1000 mg/L o ppm en el estado de tercera hoja verdadera de las malas hierbas, de los aceites esenciales de *Achillea millefolium*, *Artemisia annua*, *Artemisia verlotiorum*, *Otanthus maritimus* y *Xanthium strumarium*. Los aceites esenciales de *Thymbra capitata*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Santolina chamaecyparissus* se han probado mediante pulverización a dosis de 0,2%, 0,4% y 0,8% sobre *Erigeron bonariensis*, obteniéndose control de la especie tan solo en la aplicación de *T. capitata* al 0,4% y 0,8% (Verdeguer

*et al*, 2020). También se ha probado el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de *Eucalyptus citriodora*, *Ocimum basilicum* y *Mentha arvensis* dosificados al 5%, 7,5% y 10% sobre las malas hierbas *Anagallis arvensis*, *Cyperus rotundus* y *Cynodon dactylon*, obteniéndose un control total de *A. arvensis* con todos los aceites y todas las dosis, y un control alto de *C. dactylon* con el aceite esencial de menta en la dosis más alta (Khare *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos en este ensayo y los trabajos previos en los que se han empleado aceites esenciales como agentes de control de malas hierbas mediante pulverización señalan una interesante vía de estudio para el desarrollo de herbicidas naturales, en este caso de post-emergencia, de las malas hierbas. En la primera parte de este ensayo se observa mayor incidencia sobre las especies dicotiledóneas, con la posibilidad de añadir algún coadyuvante para mejorar su efecto sobre especies monocotiledóneas. En la segunda parte, sobre el efecto foliar sobre *N. tabacum*, observamos que dosificando el aceite esencial al 1% aún existe efecto sobre el cultivo, reduciéndose considerablemente al 0,5%. Por lo que aún se debe investigar para conocer las especies más sensibles y ajustar las dosis de tratamiento efectivas. Asimismo, las dosis empleadas en nuestro ensayo y en otros trabajos, requieren elevadas cantidades de aceite esencial para tener efecto de tal modo que su aplicación viable a gran escala requiere más estudios para encontrar cual puede ser eficiente a dosis reducidas. El efecto fitotóxico observado parece indicar que la aplicación selectiva por contacto podría ser válida para un uso localizado.

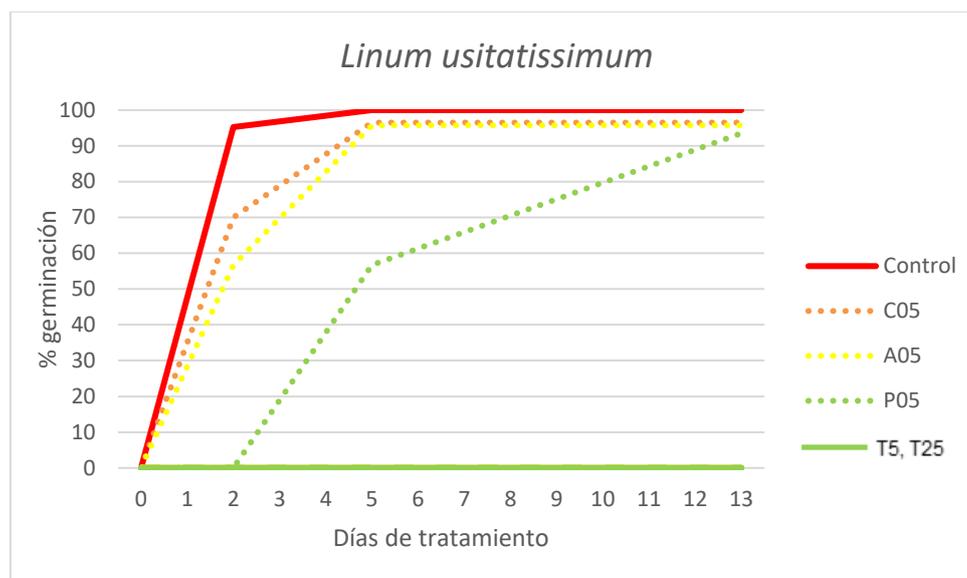
## 5.4. Ensayos de nascencia y desarrollo radicular en placas

Tal y como se describe en el apartado *IV. Material y métodos*, los ensayos fueron realizados en placas de Petri, aplicando mediante pipeteado 1 ml del tratamiento correspondiente: aceite esencial de cedro, abeto o pino a dosis de 2,5% o 25000 ppm, 0,5% o 5000 ppm y 0,05% o 500 ppm (representadas en las gráficas con los números 25, 5 y 05); o agua en el caso de los controles, sobre placas de Petri con semillas de *Linum usitatissimum*, *Lolium multiflorum* y *Nicotiana tabacum* preparadas para germinar, repitiéndose cada combinación aceite-dosis-especie vegetal, cuatro veces.

En este apartado se van a presentar los resultados obtenidos de cada combinación mediante diagramas lineales y diagramas de barras, junto con los comentarios oportunos para su explicación y evaluación.

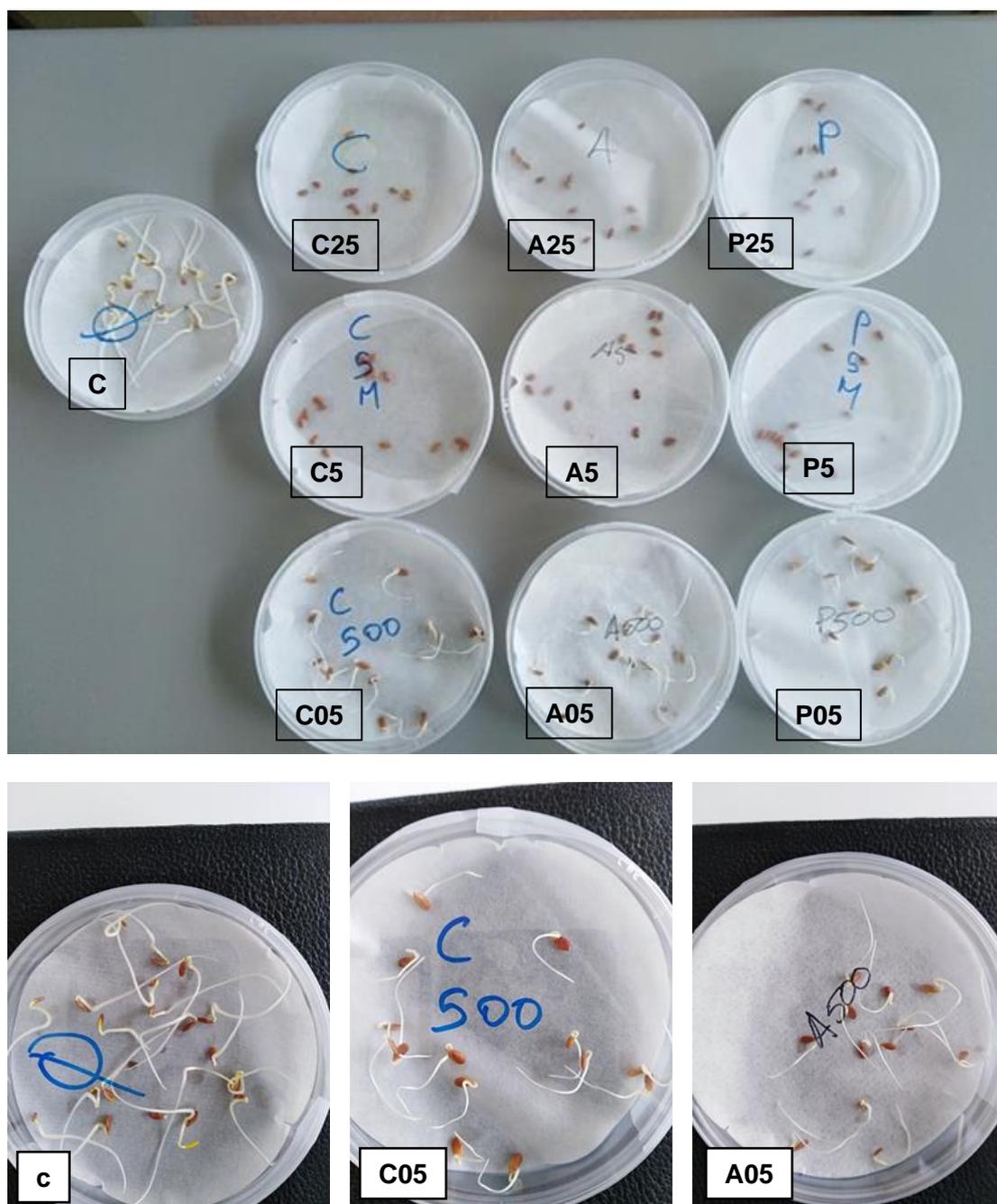
### 5.4.1. Germinación de semillas de *Linum usitatissimum*

En las siguientes gráficas se representa como han actuado los diferentes aceites esenciales en las distintas dosis sobre las semillas de *Linum usitatissimum* hasta el día 13 tras el tratamiento.



**Figura 37:** Evolución diaria de la germinación de *Linum usitatissimum* en placa de Petri frente a tratamientos con aceites esenciales al 0,05% de cedro (C05), abeto (A05) y pino (P05) y tratamientos al 0,5% (T5) y 2,5% (T25).

En esta gráfica (Figura 37) podemos observar un claro control de la germinación en los tratamientos de las dosis más altas de los tres aceites, tanto al 2,5% como al 0,5% de ellos, impidiendo totalmente la germinación de las semillas de lino. En los casos de los tratamientos con las dosis mínimas, del 0,05% se observa que las germinaciones se han visto algo retrasadas respecto al control, cuya tasa de germinación era del 95% en el segundo día desde el tratamiento, frente al 70% y 57% en los casos de los aceites de cedro y el abeto, y una germinación nula en el caso del aceite de pino. Este retraso de la germinación va perdiéndose al avanzar los días desde el tratamiento, alcanzándose valores similares al control más rápidos en el día 5 para los tratamientos de cedro y abeto, con germinaciones del 97% y 98% respectivamente, frente al 100% del control; y más lentamente en el tratamiento de pino, donde el día 5 tan solo han germinado el 60% de las semillas, pero el día 13 ya alcanza valores similares al resto de tratamientos. En la Figura 38 observamos los efectos de estos aceites en el día 13 de tratamiento.



**Figura 38:** Germinación en Placa de Petri de *Linum usitatissimum* en el día 13 de tratamiento con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%; 0,5% y 0,05%.

Tras realizar este primer análisis visual procedemos al análisis estadístico de los resultados. Mediante la prueba de Levene se observa que los datos no cumplen la homocedasticidad, por ello empleamos la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en los diferentes días de observación con el fin de comprobar si la hipótesis de que se muestran diferencias significativas entre los tratamientos y controles es cierta, mostrándose los resultados en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para *Linum usitatissimum*.

Día de tratamiento	Valor de P
2	0,000
5	0,000
13	0,000

En efecto, en la Tabla 8 se muestran valores de probabilidad menores a 0,01 lo que nos indica que existe una reducción altamente significativa de la germinación por parte de alguno de los tratamientos en todos los días de observación. Para comprobar qué factores son los significativamente diferentes en cada día de tratamiento realizamos la comparación por pares de cada tratamiento con el control mediante la U de Mann-Whitney, cuyos resultados se muestran en la Tabla 9.

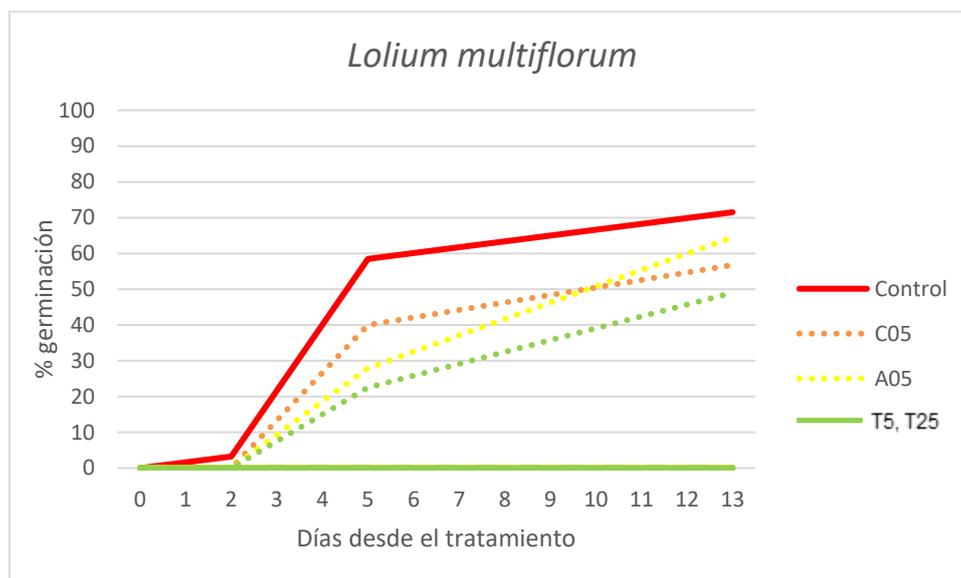
**Tabla 9:** Resultados de probabilidad de comparaciones por pares entre tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% y control con la U de Mann-Whitney para *Linum usitatissimum* en los diferentes días de observación. Donde: \* =  $P < 0,05$  (significativo), \*\* =  $P < 0,01$  (altamente significativo).

	Valor de P (%)	Día 2	Día 5	Día 13
Cedro	2,5	*	*	**
	0,5	*	*	**
	0,05	*	0,56	0,69
Abeto	2,5	*	*	**
	0,5	*	*	**
	0,05	*	0,56	0,69
Pino	2,5	*	*	**
	0,5	*	*	**
	0,05	*	0,25	0,34

Los valores de probabilidad que se muestran en la Tabla 9 como resultado de las comparaciones por pares con la U de Mann-Whitney, indican que los tratamientos de los tres aceites a las dosis mayores, del 2,5% y 0,5%, poseen significación frente al control en todos los días de observación, en los días 2 y 5 los valores de probabilidad son menores a 0,05%, lo que indica diferencias significativas entre tratamientos y control, en el día 13 las probabilidades disminuyen, hasta valores menores al 0,01, lo que indica diferencias altamente significativas entre los pares, por ello se puede afirmar que los tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% y 0,5% son capaces de inhibir la germinación *in vitro* de las semillas de lino. Por su parte, los tratamientos a menor dosis de los aceites también son significativamente diferentes para los tres aceites en el día 2 de observación desde el tratamiento, aunque todos pierden esta significación al avanzar los días, obteniéndose valores de probabilidad mayores a 0,05, por esto no podemos afirmar que los aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 0,05% sean capaces de controlar la germinación *in vitro* de las semillas de lino en los días 5 y 13 desde el tratamiento, pero sí son capaces de hacerlo los aceites de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% y 0,5%. De este modo se observa que todas las dosis son efectivas pero la dosis de 0,05% (o mayor) y que una dosis de 0,05% solo tiene efecto temporal. Sería interesante en posteriores trabajos evaluar dosis intermedias para afinar con la concentración mínima que inhiba la germinación.

#### 5.4.2. Germinación de semillas de *Lolium multiflorum*

A continuación, se representa la evolución de las semillas de *Lolium multiflorum* tras la aplicación de los diferentes aceites esenciales a sus correspondientes dosis sobre las semillas hasta el día 13 tras el tratamiento.



**Figura 39:** Evolución diaria de la germinación de *Lolium multiflorum* en placa de Petri frente a tratamientos con aceites esenciales al 0,05% de cedro (C05), abeto (A05) y pino (P05) y tratamiento a 0,5% (T5) y 2,5% (T25).

Tal como muestra la Figura 39, no se aprecian diferencias entre los tratamientos y el control en el día 2 desde el tratamiento, donde el control tiene una tasa de germinación del 3% frente a germinaciones nulas para los tres aceites en cada una de sus dosis. Las semillas tratadas con cada uno de los aceites a las dosis mayores, del 2,5% y 0,5% van a mantenerse con germinaciones nulas durante todo el periodo de observación, tal como observamos en la Figura 40, donde aparecen las semillas de *L. multiflorum* en el día 13 de tratamiento con aceite esencial de pino al 2,5% y ninguna ha germinado. No es hasta el día 5 desde el tratamiento donde se observan ciertas diferencias con las dosis más bajas de cada aceite, en este momento la germinación del control es del 59%, frente al 40%, 28% y 23% de tasa de germinación de los tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino, respectivamente, dosificados al 0,05%. Tanto la germinación del control como las de los tratamientos al 0,05% van a aumentar en el día 13 de tratamiento, con valores del 75% para el control y del 57%, 65% y 49% para los respectivos aceites, donde aparentemente el tratamiento con cedro será el que mantenga su diferencia respecto al control y los tratamientos con abeto y pino pierden parte de su acción inhibitoria de la germinación.

Mediante el análisis estadístico vamos a comprobar si son ciertas las hipótesis planteadas tras el análisis visual. Como en el caso anterior, tras la prueba de Levene se emplea la prueba de Kruskal Wallis en los diferentes días de observación para corroborar la existencia de diferencias significativas en los tratamientos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10:** Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para *Lolium multiflorum*.

Día de tratamiento	Valor de P
2	0,437
5	0,000
13	0,000

**Figura 40:** Germinación en Placa de Petri de *Lolium multiflorum* en el día 13 de tratamiento con aceite esencial de pino dosificado al 2,5%

Tal como se observa en la Tabla 10, en el día 2 desde el tratamiento no se encuentran diferencias significativas que permitan afirmar que alguno de los tratamientos aplicados sea capaz de inhibir la germinación de las semillas de *L. multiflorum*, mientras que sí se encuentran en los días 5 y 13 desde el tratamiento, donde se muestran valores menores a 0,01 (altamente significativo). Para conocer qué tratamientos son los significativamente diferentes en los días 5 y 13 desde el tratamiento, se realiza la comparación por pares enfrentando cada tratamiento con el control mediante la U de Mann-Whitney, obteniendo los resultados que aparecen en la Tabla 11.

**Tabla 11:** Resultados de probabilidad de comparaciones por pares entre tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% y control con la U de Mann-Whitney para *Lolium multiflorum* en los diferentes días de observación. Donde: \* =  $P < 0,05$  (significativo).

	Valor de P (%)	Día 5	Día 13
Cedro	2,5	*	*
	0,5	*	*
	0,05	0,14	*
Abeto	2,5	*	*
	0,5	*	*
	0,05	*	0,08
Pino	2,5	*	*
	0,5	*	*
	0,05	*	*

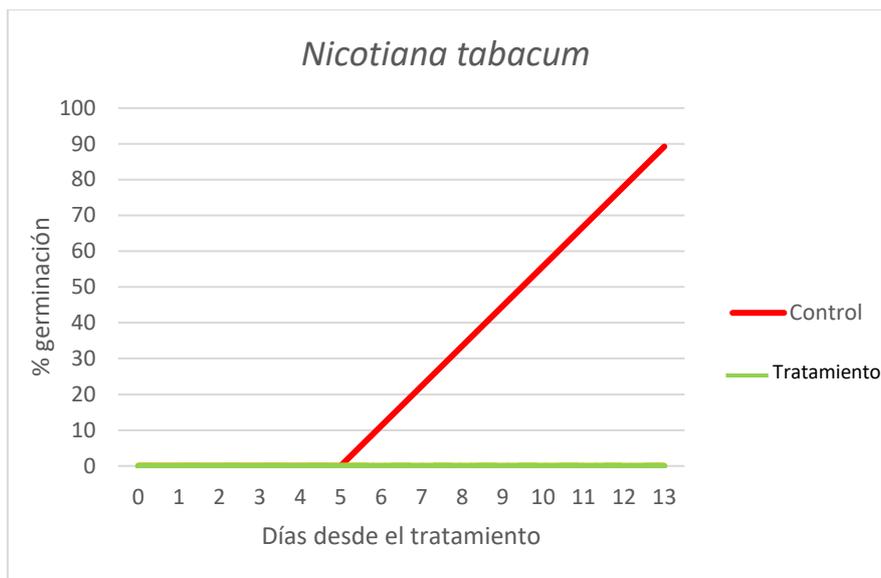
Como se observa en la tabla 11, en el día 5 desde el tratamiento se encuentran diferencias significativas en todas las comparaciones entre tratamiento y control de los aceites al poseer valores de probabilidad menores al 0,05%, salvo en la aplicación de aceite esencial de cedro dosificado al 0,05%. Al avanzar los días de observación, el aceite esencial de cedro al 0,05% alcanza diferencias significativas respecto al control en el día 13 del tratamiento, sin embargo, el aceite esencial de abeto pierde este efecto y las diferencias a los 13 días para la dosis menor no son estadísticamente significativas.

De este modo podemos afirmar que las dosis de 0,5% y superiores son efectivas frente a las dos especies (*L. usitatissimum* y *L. multiflorum*) mientras que la dosis inferior funciona solo para *L. multiflorum* con los aceites de cedro y pino

La capacidad fitotóxica de los aceites esenciales de cedro, abeto y pino no ha sido estudiada previamente sobre la germinación de semillas de *L. multiflorum*, pero otros aceites esenciales sí han sido probados con resultados satisfactorios aplicados *in vitro* sobre semillas de esta especie, como los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Mentha piperita* con control total de la germinación en sus tratamientos con dosis del 0,125, 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{L}/\text{m}$  o los aceites de *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* con controles del 47% de la germinación en los tratamientos realizados a dosis de 1  $\mu\text{L}/\text{ml}$  (Ibáñez y Blázquez, 2018a, 2018b).

#### 5.4.3. Germinación de semillas de *Nicotiana tabacum*

En las siguientes gráficas se representa la actuación de tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino en sus diferentes dosificaciones sobre las semillas de *Nicotiana tabacum* hasta el día 13 tras el tratamiento.



**Figura 41:** Evolución diaria de la germinación de *Nicotiana tabacum* en placa de Petri frente a tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino (resultados iguales a todas las dosis).

Como se aprecia en la Figura 41, la germinación de *N. tabacum* es nula en todos los tratamientos, incluido el control, hasta el día 13 de observación, donde el control alcanza una tasa del 89% mientras que los tratamientos con aceites esenciales mantienen la germinación al 0% en todas las dosis de estudio hasta el final de la observación.

El análisis estadístico nos va a permitir comprobar si es cierta la hipótesis planteada de que los diferentes aceites esenciales en las tres dosis estudiadas son capaces de controlar la germinación de las semillas de tabaco en el día 13 de observación desde el tratamiento. En los días 3 y 5 de observación no es posible realizar ningún análisis dados los valores nulos de germinación tanto de los tratamientos como del control.

La prueba de Levene indica que los datos de germinaciones del día 13 no cumplen la homocedasticidad, por lo que se emplea la prueba de Kruskal Wallis, que con un valor de  $P=0,000$  que permite afirmar que se encuentran diferencias significativas en los tratamientos. En la Tabla 12 se muestran los resultados de la comparación por pares mediante la U de Mann-Whitney para conocer qué tratamientos son los significativamente diferentes.

**Tabla 12:** Resultados de probabilidad de comparaciones por pares entre tratamientos con aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% y control con la U de Mann-Whitney para *Nicotiana tabacum* en los diferentes días de observación. Donde: \* =  $P < 0,05$  (significativo).

	Valor de P (%)	Día 13
Cedro	2,5	*
	0,5	*
	0,05	*
Abeto	2,5	*
	0,5	*
	0,05	*
Pino	2,5	*
	0,5	*
	0,05	*

Tal como muestra la Tabla 12, se encuentran diferencias significativas en todas las comparaciones entre los diferentes tratamientos y el control en el día 13 de observación, donde se obtienen valores de probabilidad menores al 0,05%. En vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que los aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5%, 0,5% y 0,05% son capaces de controlar la germinación *in vitro* de las semillas de *N. tabacum* en el día 13 desde el tratamiento.

No se encuentran estudios sobre la fitotoxicidad de aceites esenciales sobre la especie *N. tabacum*, y, aunque sí consta un estudio de las autoras Ibáñez y Blázquez (2019a), en el que comprobaron el potencial fitotóxico de los aceites esenciales de jengibre y cúrcuma sobre *Nicotiana glauca* sin encontrar resultados significativos de control a ninguna de las dosis estudiadas de 0,125, 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , dados los resultados significativos de control obtenidos en este ensayo y la ausencia de trabajos similares se plantea interesante seguir investigando los efectos de otros aceites esenciales que podrían ser empleados como bio herbicidas selectivos sobre cultivos de tabaco ya que en nuestro ensayo, los aceites de cedro, abeto y pino se muestran más efectivos con el cultivo que con las malas hierbas. Sin embargo, una aplicación selectiva de estos aceites podría ser interesante para el control de algunas de las especies estudiadas.

## 6. CONCLUSIONES

1. La germinación de semillas de *Lolium multiflorum* cultivadas sobre semilleros de plástico fue reducida por los aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% e incorporados en el riego, y en el caso de *Silene inflata* por los aceites esenciales de cedro y abeto. El efecto reductor fue temporal y desapareció con el tiempo salvo en el tratamiento de *Silene inflata* con el aceite esencial de cedro, donde el efecto fue permanente. La germinación de *Linum usitatissimum* no se vio afectada por ninguno de los tres aceites esenciales y las otras tres especies: *Lolium perenne*, *Rumex acetosella* y *Sinapis arvensis* presentaron problemas de germinación que impidieron su análisis.
2. Una segunda aplicación de aceite esencial al 2,5% en el riego solo resultó efectiva para el aceite de cedro sobre las plantas de *Silene inflata* donde la inhibición fue completa.
3. El desarrollo foliar fue reducido por el aceite esencial de cedro dosificado al 2,5% aplicado mediante pulverización en las especies arvenses *Lolium multiflorum* y *Silene inflata* y en plantas de *Nicotiana tabacum*, donde dosis menores (1% y 0,5%) también mostraron fitotoxicidad.
4. La germinación *in vitro* de las semillas de *Linum usitatissimum* fue reducida por los aceites esenciales de cedro, abeto y pino dosificados al 2,5% y al 0,5%. En el caso de *Lolium multiflorum* tuvieron efecto reductor de su germinación los aceites de cedro y pino en todas las dosis empleadas, de 2,5%, 0,5% y 0,05%, y el aceite esencial de pino dosificado al 2,5% y 0,5%. La germinación de *Nicotiana tabacum* se vio reducida por todas las dosis empleadas de los tres aceites esenciales.

## 7. REFERENCIAS

- Aktar, M. W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alzate, N. A. G., López, K., Marín, A. y Murillo, W. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1(4), 59-71.
- Amman. M. (1999). *Abies sibirica*. *Flora of China*. 4(9): 48.
- Amri, I., Gargouri, S., Hamrouni, L., Hanana, M., Fezzani, T. y Jamoussi, B. (2012). Chemical Composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, 85(2), 199-207. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0419-0>
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Gargouri, S., Fezzani, T. y Jamoussi, B. (2013). Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological agriculture & horticulture*, 29(2), 91-106. <https://doi.org/10.1080/01448765.2013.764486>
- Amri, I., Hanana, M., Jamoussi, B. y Hamrouni, L. (2017). Essential oils of *Pinus nigra* J.F. Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3877-S3882. <https://doi.org/10.1016/j.arabic.2014.05.026>
- Arribas, A. M. (2018). *Evaluación de aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo como agentes de biocontrol de hongos necrótofos in vitro e in vivo*. [Trabajo Fin de Máster, Universidad de Valladolid]. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/35324>
- Arroyo-Gallardo, V. (2012). Estudio de aislados no patogénicos para el control biológico de la fusariosis vascular (*Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas*) de planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*). [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Valladolid]. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/16535>
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K. y Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest ecology and management*, 256(12), 2166–2174. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>
- Benvenuti, S., Cioni, P. L., Flamini, G. y Pardossi, A. J. W. R. (2017). Weeds for weed control: *Asteraceae* essential oils as natural herbicides. *Weed research*, 57(5), 342-353. <https://doi.org/10.1111/wre.12266>
- Böcker, T., Möhring, N. y Finger, R. (2019). Herbicide free agriculture? A bio-economic modelling application to Swiss wheat production. *Agricultural Systems*, 173, 378–392. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.03.001>
- Cabrera, C. E. (2020). *Desarrollo de un sistema conservante con base de un extracto natural y tres aceites esenciales en la formulación de emulsiones cosméticas*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].

- Campiglia, E., Mancinelli, R., Cavaliere, A. y Caporali, F. (2007). Use of essential oils of cinnamon, lavender and peppermint for weed control. *Italian Journal of Agronomy*, 2(2), 171-178. <https://doi.org/10.4081/ija.2007.171>
- Cantó-Tejero, M., Guirao, P. y Pascual-Villalobos, M. J. (2017). El uso de aceites esenciales como insecticidas y repelentes de pulgones. *Boletín SEEA*, 2, 17-18.
- Castro, E. C., Toledo, I. R. y Vargas, L. L. (2013). Efecto insecticida de cuatro aceites esenciales sobre adultos de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* en condiciones experimentales. *Entomotropica*, 28(1), 1-10.
- Chao, S. C., Young, D. G. y Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of essential oil research*, 12(5), 639-649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>
- Chaudhary, A., Sharma, P., Nadda, G., Kumar, D. T. y Singh, B. (2011). Chemical composition and larvicidal activities of the Himalayan cedar, *Cedrus deodara* essential oil and its fractions against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Science*, 11(1): 157. <https://doi.org/10.1673/031.011.15701>
- Chaudhary, A., Sood, S., Kaur, P., Kumar, N., Thakur, A., Gulati, A. y Singh, B. (2012). Antifungal sesquiterpenes from *Cedrus deodara*. *Planta Med.* 78(2): 186-188. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280264>
- Chernyaeva, G. N. y Barakov, T. V. (1983). Seasonal dynamics of the essential oil of *Abies sibirica*. *Chemistry of natural compounds*, 19(6), 682-684. <https://doi.org/10.1007/bf00575168>
- Choi, H. J., Sowndhararajan, K., Cho, N. G., Hwang, K. H., Koo, S. J. y Kim, S. (2015). Evaluation of herbicidal potential of essential oils and their components under in vitro and greenhouse experiments. *Weed & Turfgrass Science*, 4(4), 321–329. <https://doi.org/10.5660/WTS.2015.4.4.321>
- Davarynejad, G. H. (2001). Application of urea as a post-emergence herbicide for pistachio orchards. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 56, 265-266.
- Fayemiwo, K. A., Adeleke, M. A., Okoro, O. P., Awojide, S. H. y Awoniyi, I. O. (2014). Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(1), 30-34. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60204-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60204-5)
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. y Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Flores, G. L. (2017). *Elaboración de un biopesticida a partir de nano-emulsiones en base acuosa con aceite de jengibre (Zingiber officinale) para el control de podredumbre gris (Botrytis cinerea)*. [Trabajo Fin de grado, Universidad de Quito]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/13060>
- Frabboni, L., Tarantino, A., Petruzzi, F. y Disciglio, G. (2019). Bio-herbicidal effects of oregano and rosemary essential oils on chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) crop in organic farming system. *Agronomy*, 9(9), 475. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090475>

- García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M., Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E. y Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (FA Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8-12.
- George, D. R., Sparagano, O. A. E., Port, G., Okello, E., Shiel, R. S. y Guy, J. H. (2010). Environmental interactions with the toxicity of plant essential oils to the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Medical and veterinary entomology*, 24(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00855.x>
- Gómez-Castillo, D., Cruz, E., Iguaz, A., Arroqui, C. y Vírseda, P. (2013). Effects of essential oils on sprout suppression and quality of potato cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 82, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.017>
- Harker, K. N. y O'Donovan, J. T. (2013). Recent weed control, weed management, and integrated weed management. *Weed Technology*, 27(1), 1-11. <https://doi.org/10.1614/wt-d-12-00109.1>
- Hay, J. R. (1974). Gains to the grower from weed science. *Weed Science*, 22(5), 439-442. <https://doi.org/10.2307/4042419>
- Heap, I. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science*, 70(9), 1306-1315. <https://doi.org/10.1002/ps.3696>
- Herranz, J. M., Ferrandis, P., Copete, M. A., Duro, E. M. y Zalacaín, A. (2006). Effect of allelopathic compounds produced by *Cistus ladanifer* on germination of 20 Mediterranean taxa. *Plant Ecology*, 184(2), 259-272. <https://doi.org/10.1007/s11258-005-9071-6>
- Hoai, N. T., Duc, H. V., Thao, D. T., Orav, A. y Raal, A. (2015). Selectivity of *Pinus sylvestris* extract and essential oil to estrogen-insensitive breast cancer cells *Pinus sylvestris* against cancer cells. *Pharmacognosy Magazine*, 11(2), S290 <https://doi.org/10.4103/0973-1296.166052>
- Ibáñez, M. D. y Blázquez, M. A. (2018a). Phytotoxicity of essential oils on selected weeds: Potential hazard on food crops. *Plants*, 7(4), 79. <https://doi.org/10.3390/plants7040079>
- Ibáñez, M. D. y Blázquez, M. A. (2018b). Phytotoxicity of essential oils from culinary herbs against seed germination and seedling growth of selected weeds. *International Journal Pharmacognosy Phytochemical Reseach*, 10(4), 123-131. <https://doi.org/10.25258/phyto.10.4.1>
- Ibáñez, M. D. y Blázquez, M. A. (2019a). Ginger and turmeric essential oils for weed control and food crop protection. *Plants*, 8(3), 59. <https://doi.org/10.3390/plants8030059>
- Ibáñez, M. D. y Blázquez, M. A. (2019b). Phytotoxic effects of commercial Eucalyptus citriodora, Lavandula angustifolia and Pinus sylvestris essential oils on weeds, crops, and invasive species. *Molecules*, 24(15), 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules241528472847>
- Igbedioh, S. O. (1991). Effects of agricultural pesticides on humans, animals, and higher plants in developing countries. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 46(4), 218-224. <https://doi.org/10.1080/00039896.1991.9937452>

- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10): 603-608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- James, T. K., Rahman, A., Trollove, M. y Frith, H. (2002). Efficacy of a certified organic herbicide based on pine essence. *New Zealand Plant Protection*, 55, 07-212. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2002.55.3891>
- Jaramillo-Colorado, B. E., Pino-Benitez, N. y González-Coloma, A. (2019). Volatile composition and biocidal (antifeedant and phytotoxic) activity of the essential oils of four *Piperaceae* species from Choco-Colombia. *Industrial Crops and Products*, 138, 111463. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.06.026>
- Juárez, J. R., Castro, A. J., Jaúregui, J. F., Lizano, J. V., Carhuapoma, M., Choquesillo, F. F., Félix, L. M., Cotillo, P. A., López, J. P., Córdova, A. I., Ruiz, J. R. y Ramos, N. (2010). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e investigación*, 13(1), 9-13.
- Kaab, S. B., Rebey, I. B., Hanafi, M., Hammi, K. M., Smaoui, A., Fauconnier, M. L., de Clerck, C., Jijakli, M.H. y Ksouri, R. (2020). Screening of Tunisian plant extracts for herbicidal activity and formulation of a bioherbicide based on *Cynara cardunculus*. *South African Journal of Botany*, 128, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.018>
- Kennedy, J. E., Davé, P. C., Harbin, L. N. y Setzer, W. N. (2011). Allelopathic potential of *Sassafras albidum* and *Pinus taeda* essential oils. *Allelopathy Journal*, 27(1).
- Khare, P., Srivastava, S., Nigam, N., Singh, A. K. y Singh, S. (2019). Impact of essential oils of *E. citriodora*, *O. basilicum* and *M. arvensis* on three different weeds and soil microbial activities. *Environmental technology & innovation*, 14, 100343. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100343>
- Kim, K. H., Kabir, E. y Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575(1), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kumar, S. (2019). Himalayan (Himachal region) cedar wood (*Cedrus deodara*: *Pinaceae*) essential oil, its processing, ingredients and uses: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1): 228-2238.
- Lazutka, J. R., Mierauskien, J., Slapšyt, G. y Dedonyt, V. (2001). Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha x piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and chemical toxicology*, 39(5), 485-492. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00157-5)
- Leyva, M., Tacoronte, J. E., Marquetti, M. D. C., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y. y Yirian Bruzón, R. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 60(1).
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A. y Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes*, 1, 253-269. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13)
- Marichali, A., Hosni, K., Dallali, S., Ouerghemmi, S., Ltaief, H. B. H., Benzarti, S., Kerkeni, A. y Sebei, H. (2014). Allelopathic effects of *Carum carvi* L. essential oil on

germination and seedling growth of wheat, maize, flax and canary grass. *Allelopathy Journal*, 34(1), 81-94.

Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal Natural Products*, 59(1), 77-79.

Matiz, M. G. E., León, M. G. y Osorio, F. M. R. (2015). In vitro antibacterial activity of nineteen essential oils against acne-associated bacteria. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 103-116.

Matsubara, E., Fukagawa, M., Okamoto, T., Ohnuki, K., Shimizu, K. y Kondo, R. (2011). The essential oil of *Abies sibirica* (Pinaceae) reduces arousal levels after visual display terminal work. *Flavour and fragrance journal*, 26(3), 204-210. <https://doi.org/10.1002/ffj.2056>

Medina, F. y Bautista, L. (2015). Aceites esenciales preparados en forma de nanoemulsión para la formulación de productos cosméticos. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 2(1), 6-15. <https://doi.org/10.23850/24220582.177>

Muller, W. H. (1986). Allelochemical mechanisms in the inhibition of herbs by chaparral shrubs. *The Science of Allelopathy*.

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>

Pavela, R. (2005). Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 691-696. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.06.001>

Pavela, R. (2008). Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Research*, 22(2), 274-278. <https://doi.org/10.1002/ptr.2300>

Peterson, M. A., Collavo, A., Ovejero, R., Shivrain, V. y Walsh, M. J. (2018). The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Management Science*, 74(10), 2246-2259. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>

Polyakov, N. A., Dubinskaya, V. A., Efremov, A. A. y Efremov, E. A. (2014). Biological activity of *Abies sibirica* essential oil and its major constituents for several enzymes in vitro. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(7), 456-460. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1131-6>

Reol, R. S. (2014). *Evaluación de la germinación y supervivencia de malas hierbas a partir de semillas conservadas mediante congelación (Banco de germoplasma ETSIIAA de Palencia)*. [Trabajo Fin de Máster, Universidad de Valladolid]. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/6579>

Rivera, D. D. (2008). *Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género Piper y evaluación de la actividad citotóxica* [Tesis doctoral, Universidad de San Carlos de Guatemala].

Saharkhiz, M. J., Ashiri, F., Salehi, M. R., Ghaemghami, J. y Mohammadi, S. H. (2009). Allelopathic potential of essential oils from *Carum copticum* L., *Cuminum cyminum* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Zataria multiflora* Boiss. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 31(1), 32-35.

- Santana, O., Cabrera, R., Giménez, C., González-Coloma, A., Sánchez-Vioque, R., De los Mozos-Pascual, M., Rodríguez-Conde, M. F., Laserna-Ruiz, I., Usano-Aleman, J. y Herraiz, D. (2012). Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agroindustrial en Castilla-La Mancha (España). *Grasas y Aceites*, 63(2): 214-222.
- Satyral, P., Dosoky, N. S., Kincer, B. L. y Setzer, W. N. (2012). Chemical compositions and biological activities of *Amomum subulatum* essential oils from Nepal. *Natural product communications*, 7(9). <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700935>
- Satyral, P., Paudel, P., Poudel, A., Dosoky, N. S., Moriarity, D. M., Vogler, B. y Setzer, W. N. (2013). Chemical compositions, phytotoxicity, and biological activities of *Acorus calamus* essential oils from Nepal. *Natural product communications*, 8(8). <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800839>
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, A. y Mauromicale, G. (2020). Leaf extracts of cultivated cardoon as potential bioherbicide. *Scientia horticultrae*, 261(2), 109024. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109024>
- Setia, N., Batish, D. H., Singh, H. P. y Kohli, R. K. (2007). Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. *Journal Environmental biology*, 28(1), 63-67.
- Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J. y Saraf, M. N. (1999). Membrane stabilizing activity – a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70(3): 251-257. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00030-1)
- Singh, D., Siddiqui, M. S. y Sharma S. (1989). Reproduction retardant and fumigant properties in essential oils against rice weevil (Coleoptera: *Curculionidae*) in stored wheat. *Journal of Economic Entomology*, 82(3): 727–733. <https://doi.org/10.1093/jee/82.3.727>
- Smeriglio, A., Trombetta, D., Cornara, L., Valussi, M., De Feo, V. y Caputo, L. (2019). Characterization and phytotoxicity assessment of essential oils from plant byproducts. *Molecules*, 24(16), 2941. <https://doi.org/10.3390/molecules24162941>
- Soltys, D., Krasuska, U., Bogatek, R. y Gniazdowska, A. (2013). Allelochemicals as Bioherbicides - Present and Perspectives. *Herbicides - Current research and case studies in use*, 20, 518-542. <https://doi.org/10.5772/56185>
- Survilienė, E., Valiuškaitė, A., Snieškienė, V. y Stankevičienė, A. (2009). Effect of essential oils on fungi isolated from apples and vegetables. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 28(3), 227-234.
- Swallen, J. R. (1955). *Flora of Guatemala – Part II: Grasses of Guatemala*. *Fieldiana, Botany* 24(2): 200.
- Swinton, S. M. y Van Deynze, B. (2017). Hoes to herbicides: economics of evolving weed management in the United States. *The European Journal of Development Research*, 29(3), 560–574. <https://doi.org/10.1057/s41287-017-0077-4>
- Tongnuanchan, P. y Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>

Torrenegra, M. E., Matiz, G. E., Gil, J. y León, G. (2015). Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(3).

Ustun, O., Sezik, E., Kurkcuoglu, M. y Baser, K. H. C. (2006). Study of the essential oil composition of *Pinus sylvestris* from Turkey. *Chemistry of natural compounds*, 42(1), 26-31. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0029-2>

Vats, S. (2014). Herbicides: history, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance. *Sustainable Agriculture Reviews*, 153–192. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_3)

Verdeguer, M., Castañeda, L. G., Torres-Pagan, N., Llorens-Molina, J. A. y Carrubba, A. (2020). Control of *Erigeron bonariensis* with *Thymbra capitata*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus camaldulensis*, and *Santolina chamaecyparissus* Essential Oils. *Molecules*, 25(3), 562. <https://doi.org/10.3390/molecules25030562>

Vázquez, L. L. (2012). Los insectos, los agricultores y el manejo de la finca. *Leisa*, 18(1).

Wang, S. Q., He, S. L., Zhang, M. Z., Zhang, Y. X., Wang, Q. Y., Zhang C. Y., Liu, T. Y., Liu, B., Han, J. Y., Qin, J. C. y Sampietro, D. A. (2020). Chemical composition and allelopathic potential of essential oils from *Eupatorium maculatum* on *Lolium perenne* L. and *Echinochloa crusgalli* L. *Allelopathy Journal* 49(1): 51-62. <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2020-49-1-1253>

Weir, T. L., Park, S. W. y Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>

Yang, X., Zhao, H. T., Wang, J., Meng, Q., Zhang, H., Yao, L., Zhang, Y. C., Dong, A. J., Ma, Y., Wang, Z. Y., Xu, D. C. y Ding, Y. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of pinecones of *Pinus armandii* from the Southwest region of China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(16), 1668-1672. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.217>

Young, S. L. (2004). Natural Product Herbicides for Control of Annual Vegetation Along Roadsides. *Weed Technology*, 18(03), 580–587. <https://doi.org/10.1614/wt-03-094r3>

Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R. y He, Q. (2012). Chemical Composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oil from pine needle (*Cedrus deodara*). *Journal of food science*, 77(7): 824-829. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02767.x>

Zhang, J., An, M., Wu, H., Stanton, R. y Lemerle, D. (2010). Chemistry and bioactivity of Eucalyptus essential oils. *Allelopathy Journal*, 25(2).

### **Libros consultados**

Álvarez-Iglesias, L., Garabatos, A., Puig, C., Reigosa Roger, M. y Pedrol, N. (21-23 de junio de 2012). *Búsqueda de bioherbicidas para la agricultura ecológica: compuestos naturales de origen vegetal*. IV Congreso Internacional de Agroecología e Agricultura Ecológica (CIAAE).

Angulo, A. M. (2014). *Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas. v. 1: Aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas.*

Dufort, J. (2017). *Aceites esenciales: Una guía práctica para conocer las propiedades de los aceites esenciales y sus aplicaciones.* España: Robinbook.

Ortuño, M. F. (2006). *Manual práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes.* España: Editorial Aiyana.

Ponce, R. G. (2006). *Métodos para el control de malas hierbas: Físicos y biológicos (II).* Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, secretaria general Técnica.

Recasens, J. y Conesa, J. A. (2009). *Malas hierbas en plántula. Guía de identificación.* España: Edicions de la Universitat de Lleida.

Webster, S. (1980). *New collegiate dictionary.* Merrian: C. Co., Springfield, USA.

### **Páginas web consultadas**

Alamy. *Stock photos, vectors and videos.* Recuperado de <https://www.alamy.com/>

Aceites esenciales como conservantes y potenciadores productivos (2019). *Nutrición animal.* Recuperado el 17 de enero de 2021 de <https://nutricionanimal.info/aceites-esenciales-como-conservantes-y-potenciadores-productivos/>

Arbolapp (2020). Guía de árboles silvestres de la Península Ibérica y las Islas Baleares. Recuperado de <https://www.arbolapp.es/>

Baskauf, S. (2021). *Bromus hordeaceus* (soft brome) [Fotografía]. *Go botany.* Recuperado el 25 de enero de 2021 de <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/bromus/hordeaceus/>

Crusier (2010). *Abies sibirica* in Rogów Arboretum, Poland [Fotografía]. Recuperado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Abies\\_sibirica\\_HDR.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Abies_sibirica_HDR.jpg)

Cueto, M. (2014). *Linum usitatissimum* L. [Fotografía]. *Herbario de la Universidad de Almería.* Recuperado de <http://herbario.ual.es/portfolio-items/linum-usitatissimum-l/>

Daniel, R. (20 de octubre de 2015). 100 años desde la llegada del tractor a España. *El economista agro.* Recuperado el 2 de noviembre de 2020 de <https://www.economista.es/empresas-finanzas/agro/noticias/7085947/10/15/Cien-anos-desde-la-llegada-del-tractor-a-Espana.html>

Emorsgate seeds (2004). *Lolium perenne.* Ryegrass perenne. Recuperado el 26 de enero de 2021 de <https://wildseed.co.uk/species/view/200>

Fernández, V. (2020). Aceites esenciales y sus usos cosméticos. *Innuvegan.* Recuperado el 17 de enero de 2021 de <https://innuvegan.es/los-aceites-esenciales-y-sus-usos-cosmeticos/>

Grandmont, J. P. (2007). Cèdre de l'Himalaya (*Cedrus deodara*) [Fotografía]. Recuperado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cedrus\\_deodara.JPG1b.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cedrus_deodara.JPG1b.jpg)

Groshev, I. (2000). Corteza de *Abies sibirica*, conocida comúnmente como abeto siberiano [Fotografía]. Recuperado de <https://es.dreamstime.com/corteza-del-sibirica-abies-conocida-com%C3%BAmente-como-abeto-siberiano-image129177533>

Hanan, A. M. y Mondragón J. (2009a). Malezas de México. *Linum usitatissimum*. *Conabio*. Recuperado el 1 de febrero de 2021 de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/linaceae/linum-usitatissimum/fichas/ficha.htm>

Hanan, A. M. y Mondragón J. (2009b). Malezas de México. *Rumex Acetosella*. *Conabio*. Recuperado el 26 de enero de 2021 de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/polygonaceae/rumex-acetosella/fichas/ficha.htm>

International Federation of Aromatherapists (2021). *Botanica. Ifaroma*. Recuperado el 12 de enero de 2021 de [https://ifaroma.org/es\\_ES/home/explore\\_aromatherapy/botany](https://ifaroma.org/es_ES/home/explore_aromatherapy/botany)

La guía de tres farmacéuticas para usar (bien) los aceites esenciales. (2019, 23 de diciembre). *Vogue*. Recuperado el 17 de enero de 2021 de <https://www.vogue.es/belleza/articulos/bienestar-aceites-esenciales-aromaterapia-como-usarlos-cosmetica-natural-pranarom>

Matson, S. (2008). *Rumex acetosella* [Fotografía]. *University of California*. Reuperado de [https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0908+0336](https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0908+0336)

Mesterhazy, Z. *Abies sibirica* "Lukasz" [Fotografía]. Recuperado de <https://conifersociety.org/conifers/abies-sibirica-lukasz/>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Registro de productos fitosanitarios. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>

Missouri Botanical Garden. *Cedrus deodara*. Recuperado el 3 de febrero de 2021 de <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kemperc ode=b442#:~:text=Cedrus%20deodara%2C%20know%20as%20Deodar,gracefully%20drooping%20at%20the%20tips>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2009). El enemigo número uno para los campesinos. *Fao*. Recuperado el 31 de agosto de 2020 de <http://www.fao.org/news/story/es/item/29425/icode/>

Parlamento Europeo (2018). Agricultura ecológica en la UE: nuevas reglas más estrictas (infografía). *Europarl Europa*. Recuperado el 6 de septiembre de 2020 de <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/society/20180404STO00909/agricultura-ecologica-en-la-ue-nuevas-reglas-mas-estrictas-infografia>

Peralta, J. y Royuela, M. (2019). Herbario de la Universidad Pública de Navarra. *Unavarra*. Recuperado el 23 de enero de 2021 de <http://www.unavarra.es/herbario/htm/inicio.htm>

Pérez, M. (11 de diciembre de 2012). *Abies sibirica*. *Pinaceae. Botánica y jardines*. Recuperado el 8 de febrero de 2021 de <http://www.botanicayjardines.com/abies-sibirica/>

Portillo, G. (2008). Cedro del Himalaya (*Cedrus deodara*). *JardineriaOn*. Recuperado el 8 de febrero de 2021 de <https://www.jardineriaon.com/cedrus-deodara.html>

Pražák, Z. (2006). Pino silvestre conmemorativo [Fotografía] Recuperado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Borovice\\_pod\\_Kun%C4%9Btickou\\_Horou.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Borovice_pod_Kun%C4%9Btickou_Horou.jpg)

Proyecto Anthos (2012). *Real Jardín Botánico*. Recuperado el 24 de enero de 2021 de <http://www.anthos.es/>

Saiz, M. (2018). Los aceites esenciales. Una alternativa natural a los insecticidas. *Ecorganicweb*. Recuperado el 17 de enero de 2021 de <https://www.ecorganicweb.com/los-aceites-esenciales-una-alternativa-natural-a-los-insecticidas/#:~:text=Ejemplos%20de%20estos%20aceites%20esenciales,m%C3%A1s%20frecuencia%20productos%20qu%C3%ADmicos%20sint%C3%A9ticos>.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2018). Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.): Usos y propiedades). *Gobierno de Mexico*. Recuperado el 23 de febrero de 2021 de <https://www.gob.mx/siap/articulos/tabaco-nicotiana-tabacum-l-usos-y-propiedades?idiom=es>

Tabacopedia (2015). Botánica. La planta del tabaco. Recuperado el 24 de febrero de 2021 de <https://tabacopedia.com/es/tematicas/bot%C3%A1nica/#>

Tenorio, P. (2000). *Linum usitatissimum* L. [Fotografía]. *Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Gobierno de México*. Recuperado el 20 de enero de 2021 de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/linaceae/linum-usitatissimum/fichas/pagina1.htm>

The plant list (2010). *Silene*. Recuperado el 5 de marzo de 2021 de <http://www.theplantlist.org/>

Withman, C. (2004). *Rumex acetosella*, common sheep Sorrel [Fotografía]. *University of California*. Recuperado de [https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0404+0389](https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0404+0389)