

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
**Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos**  
**Departamento de Ecosistemas Agroforestales**

---

**MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS  
AGROFORESTALES**



*Control de la germinación in vitro de Araujia sericifera con aceites esenciales de Laurus nobilis, Myrtus communis, Citrus sinensis y Citrus limon.*



**TESIS DE MÁSTER.**

Alumno:

**Dña. Melania Calle Fernández.**

Director Académico:

**D. Herminio Boira Tortajada.**

Codirectora:

**Dña. M<sup>a</sup> Amparo Blázquez Ferrer.**

**Valencia, 1 diciembre 2010**

## ÍNDICE

1. <b><u>Introducción</u></b> .....	5
2. <b><u>Antecedentes</u></b> .....	6
<b>2.1. La alelopatía como factor ecológico</b> .....	7
<b>2.1.1. Mecanismos de acción de los agentes alelopáticos</b> .....	8
<b>2.1.2. Modos de acción de los inhibidores</b> .....	9
<b>2.1.3. Modos de liberación de los agentes alelopáticos</b> .....	9
<b>2.1.4. Especies con potencial alelopático</b> .....	10
<b>2.2. Principales compuestos alelopáticos. Terpenos</b> .....	11
<b>2.2.1. Clases de compuestos identificados como agentes alelopáticos</b> .	12
<b>2.3. La flora arvense y su evolución</b> .....	14
<b>2.4. Neofitos arvenses: <i>Araujia sericifera</i> Brot.</b> .....	15
<b>2.4.1. Origen</b> .....	16
<b>2.4.2. Taxonomía</b> .....	17
<b>2.4.3. Formas de reproducción</b> .....	19
<b>2.4.4. Usos y problemática como mala hierba</b> .....	19
<b>2.4.4.1. Problemática en cultivos de cítricos</b> .....	20
<b>2.4.4.2. Actuaciones recomendadas</b> .....	21
3. <b><u>Objetivos</u></b> .....	23
4. <b><u>Material y métodos</u></b> .....	24
<b>4.1. Material vegetal</b> .....	24
<b>4.2. Condiciones y factores de germinación</b> .....	24
<b>4.3. Extracción de aceites esenciales de <i>Laurus nobilis</i> L., <i>Myrtus communis</i> L., <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck y <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.</b> .....	25

<b>4.4. Composición de los aceites esenciales de <i>Laurus nobilis</i> L., <i>Myrtus communis</i> L., <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck y <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. utilizados</b> .....	26
<b>4.4.1. Composición cualitativa de los aceites esenciales. Cromatografía de gases - espectrometría de masas</b> .....	26
<b>4.4.2. Composición cuantitativa de los aceites esenciales. Cromatografía de gases</b> .....	27
<b>4.5. Uso de aceites esenciales de <i>Laurus nobilis</i> L., <i>Myrtus communis</i> L., <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck y <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. como inhibidores de la germinación y el crecimiento de <i>Araujia sericifera</i> Brot.</b> .....	28
<b>4.6. Tratamiento de datos y programas de análisis</b> .....	29
<b>5. <u>Resultados y discusión</u></b> .....	30
<b>5.1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas</b> .....	30
<b>5.2. Composición química de aceites esenciales</b> .....	31
<b>5.3. Estudio del poder alelopático de los aceites esenciales</b> .....	40
<b>5.3.1. Test de germinación</b> .....	40
<b>5.3.2. Crecimiento de las semillas de <i>Araujia sericifera</i> Brot.</b> .....	41
<b>6. <u>Conclusiones</u></b> .....	46
<b>7. <u>Bibliografía</u></b> .....	47
<b>8. <u>Agradecimientos</u></b> .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOS.

### TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Combinación de temperaturas y fotoperíodos probados .....	24
<b>Tabla 2.</b> Extracción de los aceites esenciales .....	25
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de germinación de <i>A. sericifera</i> para las diferentes condiciones de fotoperiodo y temperatura probados .....	32
<b>Tabla 4.</b> Composición del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> .....	31
<b>Tabla 5.</b> Composición del aceite esencial de <i>Myrtus communis</i> .....	34
<b>Tabla 6.</b> Composición del aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> .....	36
<b>Tabla 7.</b> Composición del aceite esencial de <i>Citrus limón</i> .....	38
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de germinación de semillas de <i>Araujia sericifera</i> tratadas con aceites de naranjo, laurel, mirto y limón .....	40
<b>Tabla 9.</b> Longitud (mm) de plántulas de <i>Araujia sericifera</i> tratadas con aceites esenciales de naranjo, laurel, mirto y limón a los 14 días tras realizar los tratamientos (registro final del ensayo) .....	42

### FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Evolución de la germinación de <i>A. sericifera</i> combinando diferentes condiciones de temperatura y fotoperíodo .....	31
<b>Figura 2.</b> Crecimiento de plántulas de <i>A. sericifera</i> tratadas con aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml .....	43
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de plántulas de <i>A. sericifera</i> tratadas con aceite esencial de <i>Myrtus communis</i> a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml .....	43
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de semillas de <i>A. sericifera</i> tratada con aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml .....	44
<b>Figura 5.</b> Crecimiento de semillas de <i>A. sericifera</i> tratada con aceite esencial de <i>Citrus limon</i> a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml .....	44

## **FOTOS.**

<b>Foto 1.</b> Biosíntesis de los terpenos en las plantas (Fuente: Blázquez y Zafra-Polo, 2010) .....	14
<b>Foto 2.</b> Origen y distribución en España de <i>A. sericifera</i> (Fuente: Atlas de plantas alóctonas invasoras de España) .....	17
<b>Foto 3.</b> Hojas, flor, frutos y semillas de <i>A. sericifera</i> (Fuente: The art of botanical illustration) ....	18
<b>Fotos 4, 5 y 6.</b> Frutos, fruto abierto y fruto con semillas de <i>A. sericifera</i> .....	19
<b>Foto 7.</b> Cultivo de cítricos abandonado, invadido por <i>A. sericifera</i> .....	21
<b>Fotos 8 y 9.</b> Hidrodestiladores y matraz con manta calefactora .....	26
<b>Foto 10.</b> Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de la germinación de <i>A. sericifera</i> con aceite esencial de <i>L. nobilis</i> a concentración de 2 µl/4ml (0,5 µl/ml) .....	28
<b>Foto 11.</b> Placa control nº 10 día 14. Ensayo inhibición del crecimiento de <i>A. sericifera</i> con aceites esenciales de naranja, limón, mirto y laurel .....	42
<b>Foto 12.</b> Placa <i>A. sericifera</i> tratada con aceite de mirto 0,5 µl/4ml (0,125 µl/ml). Ensayo inhibición del crecimiento de <i>A. sericifera</i> con aceites esenciales de naranja, limón, mirto y laurel .....	42

## **1. Introducción.**

El aumento de la productividad agrícola depende del control de diversos factores como pueden ser la gestión de la calidad del agua, utilización de variedades resistentes a enfermedades, elección de variedades muy productivas, control de las malas hierbas, etc.

Éstas malas hierbas se definen como plantas que crecen en una localización no deseada, compitiendo por nutrientes con los otros cultivos, pudiendo contaminar con sus semillas, además de perpetuar el problema a lo largo del tiempo (Vyvyan, 2002).

El uso excesivo de productos químicos en la producción de cultivos, ha provocado serios problemas relacionados con la aparición de resistencia a herbicidas y un alto impacto en el medio ambiente. Para controlar las más de 7000 malas hierbas identificadas hasta el momento, se han utilizado grandes cantidades de dinero en químicos (Patterson 1985, Macías 1995). A pesar de ello, el problema sigue siendo difícil de solucionar debido a la disminución de la eficiencia de estos productos químicos, provocada por la resistencia que muchas hierbas adventicias han desarrollado.

La evolución de los herbicidas se ha desarrollado gracias a que cientos de productos comercialmente disponibles tienen numerosos modos de acción. El número de biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas se ha incrementado desde la expansión en el uso de herbicidas en los años 50 (Kropff *et al.* 2000). Además la nueva legislación y los consumidores concienciados por la calidad de los alimentos, ha hecho aún más importante la búsqueda de químicos con nuevos modos de acción más específicos con las malas hierbas, menor toxicidad hacia el hombre y animales y menor daño medioambiental (Dayan *et al.* 1999).

En esta línea se inscribe la búsqueda de herbicidas naturales basándose en el fenómeno de alelopatía.

## 2. Antecedentes.

El fenómeno de alelopatía ha sido plasmado en documentos que datan de unos cuantos siglos antes de cristo. Un documento del año 3000 antes de cristo relata que muchas plantas cosechadas (chicharro, cebada, frijol forrajero) destruyeron malas hierbas e inhibieron el crecimiento de otras cosechas (Rice, 1984).

El historiador Plinio el Viejo (Plinius Secundus), en el siglo I a.C. observó que al cultivar el garbanzo, la cebada y la arveja marga juntos, presentaban problemas en las cosechas. El autor establece que la sombra del nogal, causa dolor de cabeza al hombre y mata cualquier especie viva de su vecindad.

Desde épocas remotas (siglos III y V), los efectos alelopáticos de algunas plantas sobre otras han sido objeto de estudio por Theophrastus y Democritos respectivamente (Putman, 1985).

Culpeper (1633) detalla que la albahaca y la ruda no se desarrollan juntas o cerca una de la otra. También estableció que existe antipatía entre el repollo y la vid.

Young (1804) describió que el trébol presenta conflictos en su desarrollo al cultivarse en terrenos con cultivo permanente de la misma especie. El suelo adquiere una enfermedad del trébol, por la presencia de aleloquímicos provenientes de la especie cultivada en el terreno.

De Candolle, en 1832, observó que las judías mueren o retrasan su crecimiento al ser tratadas con aguas edáficas provenientes de leguminosas de la misma especie. Por otra parte el trigo se desarrollaba bien al ser tratado con esta agua.

A comienzos del siglo XX, se inicia la investigación del fenómeno y se desarrolla la experimentación con plantas, incluyendo plantas medicinales. Schreiner *et al.*, entre 1907 y 1911, descubren en suelos agotados la existencia de productos químicos provenientes de plantas de cultivo, con manifestación de efectos alelopáticos sobre otras plantas.

El fisiólogo alemán Hans Molisch en los años treinta, demuestra el efecto negativo del crecimiento de vegetales en ambiente de gas etileno generado por manzanas. Este autor acuñó la palabra “alelopatía”, para describir las acciones negativas o positivas entre las plantas, causadas en forma indirecta con compuestos químicos.

A continuación, con el paso de los años, empieza a incrementarse la investigación en este campo, aunque el proceso más exhaustivo de estudio empezó en los años sesenta con el trabajo de Muller *et al.* (1964) y el libro Allelopathy de E. L. Rice (1984).

A finales del siglo XX se estudia el modo de acción y destino de los aleloquímicos en los suelos y sus efectos en los microorganismos y nutrientes disponibles.

Este aumento en el estudio de las alelopatías, puede deberse principalmente a dos factores: el desarrollo de métodos sofisticados de aislamiento e identificación de aleloquímicos y el desarrollo de modelos experimentales innovadores. En la actualidad existen nuevos métodos de estudio relacionados con la biología molecular y la tecnología digital, teniendo como objetivo el entender la perspectiva del fenómeno de alelopatía en los ecosistemas (Mallik, 2000).

Además en los últimos años se han realizado diversos estudios sobre la germinación de arvenses; como el realizado en 2007 por Vasilakoglou *et al.* con aceites esenciales de albahaca, orégano y mejorana, de la región del Mediterráneo, para controlar la germinación de diversas hierbas (*Echinochloa cruz-galli* (L.) P. Beauv. y *Chenopodium album* L.), o el realizado en 2003 por Angelini *et al.* utilizando aceites de romero, tomillo y ajedrea, para ver sus propiedades alelopáticas sobre arvenses anuales (*Echinochloa cruz-galli* (L.) P. Beauv., *Portulaca oleracea* L. y *Chenopodium album* L.) y hortícolas (*Raphanus sativus* L., *Capsicum annum* L. y *Lactuca sativa* L.).

Así mismo se han estudiado los efectos alelopáticos de extractos acuosos de algunas plantas como *Croton bonplandianum*, sobre la germinación de semillas y plantas en semilleros de cultivos en *Triticum aestivum* L., *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. and *Brassica rapa* L. y malas hierbas como *Melilotus alba* Medik., *Vicia sativa* L. y *Medicago hispida* Gaertn (Sisodia y Siddiqui, 2010) o el efecto de *Eucalyptus globulus* Labill sobre la germinación y el crecimiento de sorgo (Bagavathy *et al.*, 2007).

## 2.1. La alelopatía como factor ecológico.

La definición más tradicional del fenómeno de alelopatía es la que la describe como “cualquier efecto, estimulador o inhibitorio, directo o indirecto causado por una planta sobre otra a través de la producción de compuestos químicos que escapan al medio ambiente” (Rice 1984). La definición más amplia, es la desarrollada por la Sociedad Internacional de Alelopatía en 1996, definiéndola como: “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos y agrícolas”.

A partir de estas definiciones es posible extraer tres rasgos imprescindibles a tener en cuenta al estudiar la existencia del fenómeno alelopático: I) liberación de un compuesto al ambiente encargado de transmitir un efecto, II) absorción por el organismo receptor y III) provocación de un efecto sobre su normal crecimiento.



La complejidad del fenómeno es resultado de las variables de cada uno de estos procesos, como por ejemplo, el mecanismo de liberación del aleloquímico y su estabilidad en el ambiente. De este modo se definirán los niveles y la forma en que el organismo receptor absorberá el aleloquímico y los innumerables modos de acción encontrados, muchas veces dependientes de la planta receptora.

### **2.1.1. Mecanismos de acción de los agentes alelopáticos.**

Para establecer la causa y efecto de la alelopatía, es preciso analizar la dinámica de producción de compuestos aleloquímicos desde su fuente, su transporte desde la planta productora hacia las plantas cercanas afectadas, y la exposición de los agentes alelopáticos en cantidad y tiempo suficiente para causar dicha alelopatía (Einhelling, 1995).

Una forma de entender los mecanismos de acción de los agentes alelopáticos podría ser a través del estudio del proceso de retención y transformación de estos compuestos en el suelo, ya que es en este, donde su transporte y destino final se ve afectado.

En el caso de estudio del efecto de los aleloquímicos en plantas, es importante considerar el estrés térmico, hídrico, enfermedades, aplicación de herbicidas y deficiencias minerales, porque son inconvenientes que pueden afectar a la cantidad de aleloquímicos producidos.

Además, existe una gran variedad de compuestos orgánicos que son liberados por numerosas especies de plantas, por lo que cada uno de ellos tiene una vida activa en el suelo, determinada por factores como volatilización, filtración, adsorción y acción microbiana (Khalid *et al.*, 2002).

Si a esto le unimos que el origen de los aleloquímicos no está claramente definido, y su actividad biológica puede verse aumentada o reducida por factores como la acción microbiana, oxidación, u otras transformaciones, es un error asumir que existe un mecanismo de acción único que explique el modo en que se ve afectada la planta receptora.

En condiciones naturales las cantidades en que se encuentran disponibles muchas de estas sustancias químicas, son inferiores a las que presentan alguna actividad en pruebas de laboratorio.

Ensayos sobre varios aislados de aleloquímicos, han demostrado que generalmente estos agentes representan a varias familias de compuestos y están asociados a diversos suelos, viendo que la combinación de los aleloquímicos puede producir interacciones sinérgicas (Abbasdokht, 2008).

### 2.1.2. Modos de acción de los inhibidores.

El estudio del modo o mecanismo de acción de los productos alelopáticos y sintéticos ha producido grandes descubrimientos para los investigadores, puesto que los modos de acción de dichos compuestos químicos están relacionados.

Liebman y Ohno (1998), indican que el efecto inhibitorio de los químicos alelopáticos sobre la germinación y el crecimiento es debido al resultado del efecto sobre muchos procesos individuales.

Según Rizvi *et al.* (1992), hay dos modos de acción de compuestos alelopáticos: indirecto y directo.

1. **Modo indirecto:** incluye los efectos ocasionados por la alteración de propiedades del suelo, del estado nutricional y de la actividad de poblaciones de organismos benéficos.
2. **Modo directo:** comprende los efectos sobre varios procesos del crecimiento y el metabolismo de las plantas. Lovett y Ryuntyu (1992) los clasifican en primarios (inhibición de la división celular, inhibición de la fotosíntesis, efectos en la respiración, efectos sobre la síntesis de proteínas, cambios en la permeabilidad de las membranas e inhibición de enzimas) y secundarios (interferencia con la germinación y el crecimiento).

### 2.1.3. Modos de liberación de los agentes alelopáticos.

Hay toda una variedad de agentes alelopáticos que se sintetizan y almacenan en diferentes células de la planta, ya sea en forma libre o conjugada con otras moléculas, y que son liberados al entorno como respuesta a factores de estrés biótico y abiótico.

Los biocomunicadores, son compuestos químicos implicados en las interacciones entre los seres vivos. Los agentes alelopáticos o compuestos aleloquímicos son los biocomunicadores causantes de fenómenos alelopáticos.

Las plantas superiores liberan regularmente compuestos orgánicos por volatilización de sus superficies y a través de lixiviados de hojas y exudados de raíces. Eventualmente, los constituyentes químicos de todos los organismos son liberados al entorno a través de procesos de descomposición, incorporándose a la matriz del suelo. Por tanto existen cuatro vías principales de liberación al entorno de los aleloquímicos; estos son: volatilización, lixiviación, exudados radiculares y descomposición de residuos vegetales (Sampietro, 2002)

### **1. Volatilización.**

La liberación de agentes alelopáticos por volatilización se produce en plantas que producen etileno y aceites esenciales volátiles, los cuales están constituidos fundamentalmente por terpenoides.

En ecosistemas desérticos y mediterráneos, la liberación de compuestos alelopáticos a través de volatilización es un mecanismo frecuente, debido al predominio de altas temperaturas.

### **2. Lixiviación.**

La lixiviación es la extracción acuosa de sustancias presentes en la planta por efecto de la lluvia, nieve, niebla o rocío. Su efectividad depende del tipo de tejido vegetal, la edad de la planta y la cantidad y naturaleza de la precipitación.

### **3. Exudación.**

La reducción del rendimiento observada en algunos cultivos tradicionales se ha atribuido a toxinas liberadas por otros cultivos y malas hierbas asociadas. Se conocen sustancias exudadas por las raíces que reducen la germinación de las semillas, el crecimiento de raíces y brotes, la incorporación de nutrientes y la nodulación. Factores como la edad del vegetal, la nutrición, la luz y la humedad influyen tanto cualitativamente como cuantitativamente en la liberación de sustancias por las raíces. El efecto de los exudados radiculares ha sido extensamente estudiado por el efecto que tiene sobre las propiedades del suelo, tanto la presencia del exudado en sí, como las modificaciones microbianas causadas por este exudado.

### **4. Descomposición de residuos vegetales.**

Los residuos en descomposición de las plantas liberan una gran cantidad de agentes alelopáticos. Los factores que influyen en la naturaleza de los compuestos incluyen la composición del residuo, el tipo de suelo y las condiciones de descomposición, siendo los compuestos solubles en agua los que más rápidamente pueden ser liberados.

#### **2.1.4. Especies con potencial alelopático.**

Muchos estudios han explorado el potencial alelopático de especies de plantas de diferentes familias, gran parte de ellos enfocados a la búsqueda de compuestos químicos con actividad herbicida, así como a los efectos de cultivos sobre arvenses, sobre otros cultivos, sobre sí mismos, y sobre otras arvenses (Stachon y Zimdahl, 1980, Tominaga y Watanabe, 1997).

Como ejemplo podemos citar el estudio de *Lantana camara* L. en la germinación y crecimiento de semillas de arvenses en algunos cultivos agrícolas como arroz (Bansal, 1998; Oudhia y Tripathi, 1999), trigo (Oudhia y Tripathi, 2000), soja (Oudhia, 1999) y plantas arvenses mediterráneas (Verdeguer *et al.*, 2009).

También se han observado buenos resultados con herbicidas estudiados en algunas especies del género *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) sobre vegetación anual (May y Ash, 1990; Alves *et al.*, 1999, Verdeguer *et al.*, 2009).

Incluso se han realizado trabajos para ver el comportamiento alelopático de cultivos como el girasol (*Helianthus annuus* L.) en la germinación y desarrollo de algunas malezas bajo condiciones de campo controladas en diferentes épocas del año, obteniendo un efecto inhibitorio de las malezas tanto en período de primavera como en el de invierno (Puente *et al.*, 2003).

Además, con respecto al efecto alelopático de extractos vegetales, Duke *et al.* (2002) efectuaron una excelente revisión de compuestos químicos naturales para el control de arvenses.

## **2.2. Principales compuestos alelopáticos. Terpenos.**

La mayoría de los compuestos liberados por las plantas son metabolitos secundarios producidos como resultado de las rutas metabólicas primarias (Hadacek, 2002). Dependiendo de su acción fitotóxica, su concentración bioactiva y su persistencia y destino en el entorno en que son liberados, pueden actuar como compuestos alelopáticos (Inderjit y Duke, 2003). Además, en la naturaleza, la actividad alelopática está probablemente originada por la acción conjunta de varios aleloquímicos, más que por la acción de uno solo (Inderjit *et al.*, 2002; Inderjit y Duke, 2003). Hoy en día existe un gran debate con relación al papel que realizan los metabolitos secundarios como aleloquímicos en los ecosistemas naturales y, en concreto, durante el proceso de invasión. El principal problema que se plantea es que la baja concentración a la que se encuentran los metabolitos secundarios en condiciones de campo, es insuficiente para provocar una respuesta fitotóxica (Tharayil, 2009). A pesar de este controvertido debate, en las últimas décadas se han empleado esfuerzos considerables para demostrar la mediación de compuestos liberados por plantas alóctonas en los procesos de invasión (Carballeira y Reigosa, 1999; Callaway y Ridenour, 2004; Callaway *et al.*, 2005b; Lorenzo *et al.*, 2008; Ens *et al.*, 2010; Jarchow y Cook, 2009).

Tratar de identificar cada uno de los compuestos químicos del extracto y determinar cuál es el responsable del efecto alelopático es una tarea muy complicada y difícil de abordar. Sin embargo,

hay trabajos en los que la actividad alelopática en los ecosistemas está relacionada con determinados grupos de compuestos, por ejemplo, fenoles simples, flavonoides, terpenoides, alcaloides, ácidos grasos, poliacetilenos, compuestos sulfurados, oligopéptidos (Macías *et al.*, 2007) y glucosinolatos (Müller, 2009). Son escasos los trabajos en los que el efecto alelopático de una especie invasora está asociada a una o varias moléculas identificadas.

### 2.2.1. Clases de compuestos identificados como agentes alelopáticos.

Muchos compuestos que tienen efectos sobre procesos fisiológicos de las plantas, dependiendo de su concentración o de las formas en que se utilicen, resultan perjudiciales para otras especies o para la misma que los produce; es el caso del etileno, que ha sido utilizado como hormona para favorecer algunas especies vegetales y que Evanari (1949) referencia como agente alelopático. La naturaleza química de los compuestos alelopáticos es variable y diversa; a continuación se referencian los tipos de compuestos más estudiados, centrándonos principalmente en los compuestos presentes en los aceites esenciales, ya que en este trabajo será estudiado su efecto alelopático.

1. **Gases tóxicos:** este tipo de compuestos se encuentra referenciado por Evanari (1949), y entre ellos está el etileno. Especies de la familia Cruciferae emiten una serie de gases tóxicos, principalmente amoníaco e isocianato, que llegan a ser letales para los microorganismos patógenos que se encuentran en el suelo.
2. **Lactonas simples no saturadas:** son estudiadas por Evanari (1949), y entre ellas se encuentra el ácido parasórbico encontrado en *Sorbus aucuparia* L.
3. **Cumarinas:** pertenecen al grupo de las lactonas del ácido o-hidroxicinámico con cadenas de isoprenoides, psoraleno (furano cumarina) o heterósidos de cumarinas, esculina; son potentes inhibidores de la germinación (Rice, 1984). Los inhibidores de este grupo comúnmente son producidos por granos de leguminosas y cereales (Putnam, 1985).
4. **Quinonas:** algunos compuestos de este grupo se han examinado para su actividad herbicida, y otros tienen comprobados efectos adversos sobre las plantas (Putman, 1985).
5. **Flavonoides:** Rice (1984) aisló flavonoides de asociaciones de vegetación clímax que resultaron ser fuertes inhibidores de bacterias nitrificantes y de la germinación de semillas.
6. **Taninos:** en este grupo están incluidos tanto los taninos hidrolizables como los condensados. Los primeros están implicados en la inhibición de la germinación (Rice, 1984). Muchos residuos de plantas (sobre todo de especies leñosas) contienen taninos

hidrolizables (Rice y Pancholy, 1973), algunos de los cuales inhiben la nitrificación, y un producto sintético derivado de ellos, la nitrapirina, es comercializada con este propósito (Putman, 1985).

7. **Alcaloides:** Evanari (1949), precisó que los alcaloides son potentes inhibidores de la germinación; se han extraído de semillas de tabaco, café y cacao.
8. **Terpenos y esteroides:** las plantas superiores que se desarrollan en zonas áridas y semiáridas, sintetizan terpenoides. Los terpenos y esteroides, elaborados a partir de los mismos precursores, constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios de los vegetales. La inmensa mayoría de los terpenos, aunque no todos, se encuentran en el reino vegetal.

Todos los terpenos, tienen algo esencial en común, se puede considerar que se forman por el acoplamiento de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del 2-metil-1,3-butadieno (Bruneton, 1991). El nombre proviene de los primeros miembros de esta clase; que fueron derivados del aguarrás ("turpentine" en inglés, "terpentin" en alemán). Cuando los terpenos son modificados químicamente, por ejemplo por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, suelen denominarse terpenoides (como la vitamina A o el retinol, que contiene un átomo de oxígeno).

Los terpenos se originan por polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes. La mayoría de los terpenos tienen estructuras policíclicas, las cuales difieren entre sí no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono. Los monómeros generalmente son referidos como unidades de isopreno porque la descomposición por calor de muchos terpenos da por resultado ese producto; y porque en condiciones químicas adecuadas, se puede inducir al isopreno a polimerizarse en múltiplos de 5 carbonos, generando numerosos esqueletos de terpenos. Por eso se relaciona a los terpenos con el isopreno, si bien se sabe ya desde hace más de 100 años que el isopreno no es el precursor biológico de esta familia de metabolitos. La biosíntesis de los terpenos en las plantas es a través de la vía del ácido mevalónico (Goodwin, 1971).



**Foto 1.** Biosíntesis de los terpenos en las plantas.

(Fuente: Blázquez y Zafra-Polo, 2010).

La clasificación de los terpenos según su estructura química, se hace en base al número de unidades isopreno presentes. Se clasifican en: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Blázquez y Zafra-Polo, 2010).

Los monoterpenos, formados por el acoplamiento de dos unidades isoprenicas, son los constituyentes más sencillos de la serie terpénica, los denominados monoterpenos regulares son constituyentes comunes de los aceites esenciales y óleo-resinas; los monoterpenos irregulares dan lugar a las piretrinas, dotadas de actividad insecticida. Los sesquiterpenos, amplio conjunto de derivados C<sub>15</sub>, presentan una gran variabilidad estructural y al igual que los monoterpenos, son constituyentes habituales de los aceites esenciales y responsables con ellos de sus propiedades farmacológicas o toxicológicas.

Los monoterpenos presentes en los aceites esenciales de los vegetales son notables alelopáticos, inhibidores de crecimiento de plantas superiores y malezas, siendo en este grupo donde encontramos la mayor cantidad de inhibidores del crecimiento y germinación (Putnam, 1985). Entre los más estudiados están  $\alpha$  y  $\beta$  pineno, alcanfor y 1,8-cineol, generados por *Salvia* spp., *Amaranthus*, *Eucalyptus*, *Artemisia* y *Pinus*.

### 2.3. La flora arvense y su evolución.

La flora arvense está constituida por las plantas asociadas a los cultivos, conocidas como malas hierbas. La flora arvense autóctona, además de un problema para los agricultores, también es una parte importante de la biodiversidad vegetal de nuestro territorio, tiene valor en sí misma y por su contribución al mantenimiento de otras especies, como aves o insectos.

Las malas hierbas se han extendido globalmente, generalmente asociadas a muchos cultivos, por lo que muchas de las especies arvenses son introducidas procedentes de otros lugares.

Estas plantas alóctonas, se caracterizan por su alta capacidad de dispersión, gran persistencia y por ser muy competitivas. Disminuyen el rendimiento del cultivo, interfieren con estructuras agrarias, como canalizaciones de agua, o en los procesos de cosechado y comercialización. Aunque hay que tener en cuenta que no siempre son invasoras, ya que solo el 2-3% de plantas alóctonas llegan a provocar cambios en los ecosistemas.

La evolución de la flora arvense se debe principalmente a la resistencia que estas han desarrollado frente a los herbicidas. En 1954 cuando se cuestiona seriamente la posibilidad de que exista dicha resistencia y en 1956 se predice que esto supone un problema en los cultivos, pero no es hasta 1979 cuando se reconoce la resistencia de *Senecio* sp. resistente a la atrazina.

Por ello, en 1990 se crean Comités de Prevención de Resistencias, aunque estos ejercen poca influencia.

En 1995 se crea la red de especies con resistencias ([www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)).

En 1997 se subestima la posibilidad de la resistencia a glifosato, pero es en 2001, cuando ya se dice que la evolución de la resistencia a herbicidas es mucho más rápida que a otros caracteres morfológicos y fisiológicos (Gressel, 2009).

#### **2.4. Neofitos arvenses: *Araujia sericifera* Brot.**

En España, son muchas las plantas espontáneas, consideradas malas hierbas en el cultivo de cítricos; unas se desarrollan en invierno-primavera y otras en verano, aunque las que realmente poseen importancia agronómica son las de verano. Su efecto más importante es a través de la competencia por nutrientes que ejercen con las plantas cultivadas, pero también se ha demostrado un efecto negativo como huéspedes intermedios de algunas plagas y enfermedades.

La mayor parte de estas especies son monocotiledóneas, aunque recientemente se han difundido de modo notable algunas dicotiledóneas, como por ejemplo *Araujia sericifera*, neófito arvense de los cultivos mediterráneos de cítricos (De Barreda, 1976; Agustí, 2003).

La presencia de esta nueva arvense así como de otras especies americanas, se destaca principalmente en cuatro hábitats diferentes: jardines, cultivos anuales de primavera-verano de



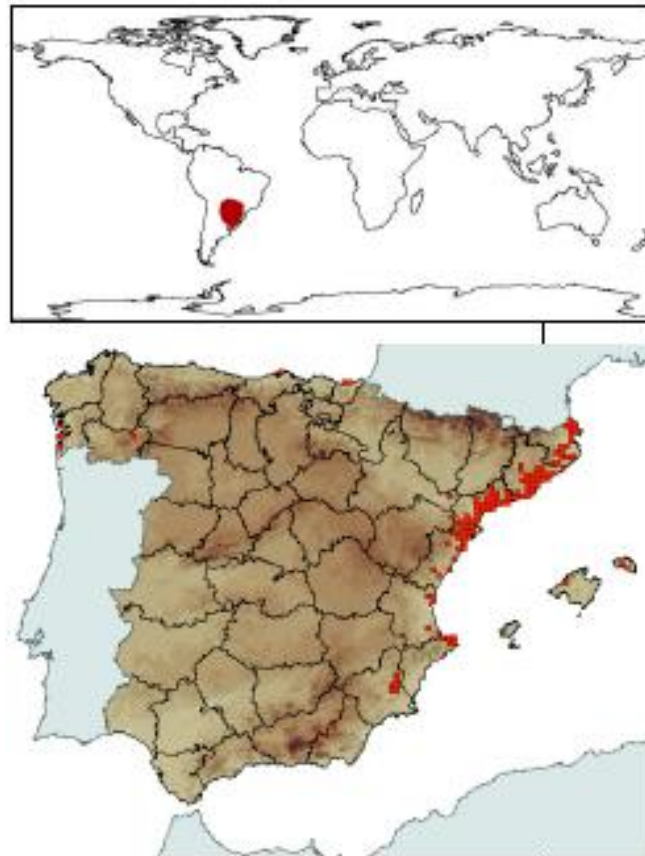
regadío, cultivos anuales de primavera-verano de secano y frutales de regadío. Esta mayor presencia se debe a que son lugares influenciados por el tránsito humado y por la introducción de nuevos cultivares en explotación. Por lo que es probable que cultivos como el algodón, tabaco y maíz, probablemente actúen como vías de introducción de neófitos (Pujadas et al., 1997).

### **2.4.1. Origen.**

*Araujia sericifera* Brot. es una planta originaria de la parte oriental de Sudamérica (nordeste de Argentina, Uruguay, Paraguay, sudeste de Brasil), donde crece en comunidades viarias y ruderales (Foto 1).

Fue introducida en Europa durante el siglo XIX como planta ornamental y también como textil para aprovechar la fibra del fruto. La cita más antigua en España, es del año 1976, concretamente de la provincia de Gerona (Sanz *et al.*, 2004).

En España está muy extendida, presenta una tendencia poblacional muy expansiva en la costa mediterránea, colonizando todo tipo de hábitats, sobre todo por el litoral de Cataluña, encontrándose naturalizada en todas las comarcas cercanas al mar, penetrando poco hacia el interior. También es frecuente en la Comunidad Valenciana, sobre todo en las zonas litorales de las provincias de Castellón y Valencia, y más raramente en Alicante. Se encuentra igualmente en las islas Baleares (Mallorca y Menorca), Murcia, Almería (Abrucena, Tíjola), Granada (Órjiva), País Vasco, Cantabria (Santander) y Galicia (Tuy, Pontevedra y Portomourisco en la provincia de Orense). Por otra parte, no se encuentra en el archipiélago de Canarias aunque sí en el de las Azores (Sanz, *et al.*, 2004) (Foto1).



**Foto 2.** Origen y distribución en España de *A. sericifera*.  
(Fuente: Atlas de plantas alóctonas invasoras de España).

### 2.4.2. Taxonomía.

La identidad y el nombre botánico correcto de *Araujia sericifera*, ha sido cuestión de controversia taxonómica durante bastante tiempo. En la literatura actual, es conocida ya sea como *Araujia sericifera* Brot. o *A. hortorum* Fournier (Forster y Bruyns 1992). En Nueva Zelanda, es conocida como *A. sericifera* (Webb *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 2004).

Comúnmente se llama planta cruel, parra o de la polilla. Éste último nombre se debe a que algunos insectos, y más particularmente polillas y mariposas pueden ser atrapadas dentro de sus flores (Waipara *et al.*, 2006).

Su clasificación botánica según Cronquist System es:

- Clase: Magnoliopsida.
- Subclase: Asteridae.
- Orden: Gentianales.

- Familia: Asclepiadaceae.
- Género: *Araujia*.
- Especie: *Araujia sericifera*.

Es una liana leñosa de crecimiento muy rápido, favorecido por la presencia de cualquier tipo de soporte, ya sea natural (árboles, cañaverales) o artificial (alambradas, plantaciones frutales, plantas de jardín), de hasta 5 m de longitud.

Posee hojas opuestas, con pecíolo de 1-2 cm y limbo ovado-oblongo o subtriangular, de hasta 3 x 5 cm, agudo en el ápice y truncado en la base, verde y glabro por el haz y grisáceo y pubescente por el envés, y con inflorescencias en cimas axilares.

Su cáliz tiene 5 sépalos ovados, de aproximadamente 1 cm de longitud. La corola es un tubo de 1 cm y tiene 5 lóbulos patentes, de 7-9 x 4 mm, oblongos, obtusos; de color blanco o verdoso por la cara dorsal y púrpura por la ventral.



**Foto 3.** Hojas, flor, frutos y semillas de *A. sericifera* (Fuente: The art of botanical illustration).

El fruto es un folículo de 8-12 x 5-6 cm, pruinoso, de color verdoso, péndulo, madurando a finales del estío.

Las semillas son muy numerosas, provistas de una especie de vilano sedoso. Floreciendo de mayo a septiembre (Sanz *et al.*, 2004) y madurando sus frutos de octubre a noviembre (Costa y Morla, 1989).



Fotos 4, 5 y 6. Frutos, fruto abierto y fruto con semillas de *A. sericifera*.

### 2.4.3. Formas de reproducción.

Se reproduce principalmente por semilla de dispersión anemócora, aunque debido a su tamaño la distancia no puede ser muy larga.

Puede dispersarse secundariamente a través del agua.

Se reproduce también asexualmente por medio de esquejes, de manera directa.

En su región de origen (Latinoamérica) para polinizarse necesita la participación de una especie de lepidóptero nocturno, y en nuestro país se han señalado como posibles polinizadores pequeños himenópteros no identificados, tal vez pertenecientes a varias especies (Sanz *et al.*, 2004). Además también tenemos que tener en cuenta que esta planta ejerce una atracción sobre mariposas, cosa importante en la polinización entomófila (Costa y Morla, 1989).

### 2.4.4. Usos y problemática como mala hierba.

El género *Araujia* es utilizado principalmente con fines medicinales (por sus propiedades galactógenas, para tratar empachos y favorecer la dentición), alimenticios (frutos) y ornamentales (Bucciarelli *et al.*, 2008).

También pueden aprovecharse sus frutos desecados, que al estar llenos de un material algodonoso sirven para rellenar cojines, almohadas o edredones. Asimismo, su fruto produce un

líquido pastoso blanco muy similar al látex de *Hevea brasiliensis* o *Ficus benjamina* (Gaig *et al.*, 2005).

Se ha constatado su presencia con carácter invasor en diversas áreas del mundo, como Australia, Nueva Zelanda, EE.UU. (California), Israel y Sudáfrica.

En Australia se encuentra ampliamente extendida, invadiendo tanto bosques húmedos como esclerófilos secos.

En Nueva Zelanda, donde invade setos, bosques y matorrales, ha sido necesario elaborar planes de erradicación en varias regiones, como el que se aplicó en el año 1995 en las islas Poor Knights.

En EE.UU. se encuentra incluida en la lista nacional de malezas y especies invasoras nocivas (USDA National Plant Board State Regulated Noxious Weeds).

En España, se trata de una especie invasora muy agresiva, que invade tanto medios profundamente alterados (jardines, cerramientos, vías de comunicación, etc.) como restos de vegetación climácica, contribuyendo a su desaparición al ahogar al arbolado natural (encinas). El daño es aún más grave si tenemos en cuenta lo reducidas que son las escasas manifestaciones de vegetación climácica que todavía quedan en las zonas costeras mediterráneas donde abunda la especie, sobre las que lamentablemente no se ha aplicado ninguna medida de protección. Ejerce competencia directa por la luz en zonas de encinares y de vegetación riparia. Por ejemplo, en la comarca del Baix Camp (Tarragona) convive con *Fraxinus angustifolia* Vahl, *Populus alba* L., *Quercus faginea* Lam., *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., *Smilax aspera* L., *Rubia peregrina* L. subsp. *longifolia* (Poiret) O. Bolòs, etc.

#### **2.4.4.1. Problemática en cultivos de cítricos.**

La flora arvense de los cultivos de cítricos ha recibido cierta atención (Boira y Carretero, 1992; Carretero, 1994; Ríos *et al.*, 1999) y su conocimiento es muy importante por varias razones. Desde el punto de vista productivo es absolutamente conveniente restringir la abundancia de estas especies para evitar en lo posible la aparición de fenómenos indeseables de competencia. Por otra parte, es conocido que algunas especies de malas hierbas pueden interactuar con organismos parásitos de los cítricos y, de esta manera, convertirse en focos potenciales de irradiación de plagas y enfermedades (Lopes *et al.*, 2003). Además en algunas ocasiones, las plantas arvenses pueden atraer a insectos benéficos, por ello las malas hierbas son objeto de una controversia inherente en la práctica de la agricultura (Mas y Verdú, 2005).

*Araujia sericifera* se ha convertido en una peligrosa mala hierba en las plantaciones de agríos de Levante, al trepar por los troncos y encaramarse en las copas de los naranjos y demás especies cítricas (Sanz *et al.*, 2004).

Es una especie muy versátil en su capacidad adaptativa, ligada a zonas prácticamente libres de heladas invernales, donde invade los huertos de naranjos, por donde asciende de tal forma que en ocasiones llega a ocultar su follaje; compitiendo así, no solo por el agua y nutrientes, sino también por la radiación solar (Sobrino *et al.*, 2002).



**Foto 7.** Cultivo de cítricos abandonado, invadido con *A. sericifera*.

#### **2.4.4.2. Actuaciones recomendadas.**

No hay referencias en cuanto a control biológico para esta especie. El método de lucha más eficaz y recomendable, aunque muy costoso es la eliminación manual de las plantas allá donde aparezcan. Puede realizarse arrancando las plántulas y los individuos jóvenes y talando por la base los tallos de los ejemplares adultos.

Todos los restos de plantas arrancadas deber ser retirados y destruidos, especialmente los frutos cargados de semillas, para los cuales lo mejor es quemarlos. Los operarios que realicen la labor deben proteger sus manos con guantes, ya que la planta emite un látex muy irritante al entrar en contacto con la piel o con los ojos. Las operaciones deben llevarse a cabo durante varios años, hasta agotar el banco de semillas del suelo.

En cuanto a los métodos químicos de lucha, se ha empleado el herbicida Escort, aplicado con mochila, disuelto a razón de 5 gr de producto por cada 10 litros de agua, teniendo cuidado de que el herbicida no alcance a la planta hospedante ni a la vegetación natural próxima. El método químico sólo es aconsejable en casos de infestaciones graves. Para poblaciones pequeñas es preferible el método de retirada manual.

En el cultivo de los agrios se controla químicamente utilizando herbicidas selectivos para estos cultivos (Mas y Verdú, 2005).

### **3. Objetivos.**

*A. sericifera* es una planta arvense muy importante que afecta a los cultivos de cítricos en la Comunidad Valenciana. Los objetivos del siguiente trabajo son:

- Estudiar los efectos de la luz y temperatura sobre la capacidad de germinación de *Araujia sericifera*.
- Determinar la composición química de los aceites esenciales de cuatro plantas comunes en la vegetación mediterránea española como son: *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f.
- Verificar el efecto fitotóxico de los aceites esenciales de *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f., sobre la germinación y el crecimiento de *A. sericifera*.



## 4. Material y métodos.

### 4.1. Material vegetal.

Con objeto de extraer semillas para los ensayos de germinación se recogieron frutos de *A. sericifera* Brot en campos de cultivo de *Citrus sinensis* en el Puerto de Sagunto (Valencia), a principios de Diciembre de 2008 y 2009. Los frutos fueron abiertos por la mitad y secados en laboratorio durante 15 días a temperatura ambiente, después las semillas fueron extraídas y seleccionadas, eliminando las que tuvieron tamaño, color, forma o estado de maduración anómalo. Las semillas se conservaron en placas Petri de 9 cm de diámetro selladas con Parafilm, a temperatura ambiente, hasta ser utilizadas en los ensayos de germinación.

### 4.2. Condiciones y factores de germinación.

La germinación de semillas de *A. sericifera* fue evaluada *in vitro*, combinando diferentes condiciones de temperatura y fotoperíodo (Tabla 1). Se sembraron 20 semillas en placas Petri (de 9 cm de diámetro), utilizando como sustrato dos discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro y 50 g/m<sup>2</sup> de espesor, situados por debajo y por encima de las semillas, que fueron humedecidos con 4 ml de agua destilada, sellando las placas con Parafilm. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Las placas fueron incubadas en cámara de cultivo F4, marca ASL.

Para evaluar la mejor combinación fotoperíodo-temperatura el número de semillas germinadas se registra cada 3, 6, 8, 10 y 13 días.

**Tabla 1.** Combinación de temperaturas y fotoperíodos probados.

	Horas luz	Horas oscuridad	T <sup>a</sup> luz °C	T <sup>a</sup> oscuridad °C
<b>Fotoperíodo 1</b>	14	10	32	24
	14	10	30	16
	14	10	26	16
<b>Fotoperíodo 2</b>	16	8	35	25
	16	8	30	20
	16	8	28	20
	16	8	28	16

### 4.3. Extracción de aceites esenciales de *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f.

Para la extracción de los aceites esenciales se recolectaron hojas de *L. nobilis*, *M. communis* y *C. sinensis* variedad Navelina en jardines y campos de Moncada (Valencia), y hojas de *C. lemon* variedad Eureka del huerto de cítricos de la Universidad Politécnica de Valencia, a principios de Marzo de 2010.

Se extrajeron 3 muestras de aceite esencial de cada especie, mediante hidrodestilación (Tabla 2). Para ello se utilizó un aparato tipo Clevenger, y matraces redondos de 2 y 4 l, introduciendo el material fresco previamente pesado en balanza de precisión, añadiendo 1000 ó 2000 ml de agua destilada respectivamente, dependiendo de la cantidad de muestra utilizada en la destilación.

Mediante una manta calefactora se aplica calor al matraz redondo, generándose vapor de agua, que arrastra los componentes volátiles de la droga, condensándose en el refrigerante, y pasando al tubo colector graduado, donde se separa el aceite esencial. Este proceso se mantuvo durante 3h, finalizando la destilación cuando se observó que la cantidad de aceite esencial destilado no aumentaba en un periodo de 30 minutos.

**Tabla 2.** Extracción de los aceites esenciales.

	MUESTRA	PESO (g)	ACEITE OBTENIDO (ml)	Rendimiento (%)
<i>Laurus nobilis</i>	MLn1	399,07	1,45	0,36
	MLn2	111,31	0,4	0,36
	MLn3	118,2	0,2	0,17
<i>Myrtus communis</i>	MMc1	424,27	1,23	0,29
	MMc2	148,76	0,8	0,54
	MMc3	167,05	0,6	0,36
<i>Citrus sinensis</i>	MCs1	1341,03	1,36	0,10
	MCs2	117,66	0,2	0,17
	MCs3	108,42	0,21	0,19
<i>Citrus limon</i>	MCl1	769,18	1,15	0,15
	MCl2	130,58	0,49	0,38
	MCl3	123,73	0,48	0,39

Los aceites esenciales se recogieron en viales de cristal graduados, conservándolos en nevera a 4°C hasta su análisis o su utilización en los ensayos.



Fotos 8 y 9. Hidrodestiladores y matraz con manta calefactora..

#### **4.4. Composición de los aceites esenciales de *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f. utilizados.**

De cada aceite esencial obtenido se preparó una dilución al 10% con hexano para su análisis en cromatografía de gases-espectrometría de masas (análisis cualitativo) y cromatografía de gases (análisis cuantitativo).

##### **4.4.1. Composición cualitativa de los aceites esenciales. Cromatografía de gases-espectrometría de masas.**

La cromatografía de gases-espectrometría de masas, fue realizada con un aparato Varian Saturn 2000 equipado con una columna capilar Varian C.S. VA-5MS de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. El modo de inyección empleado fue en split con un ratio de 1:25.

El programa de temperatura de la columna utilizado fue 60°C durante cinco minutos, con un gradiente de 3°C/min hasta llegar a 180°C, a continuación se empleo un gradiente de 20°C/min hasta llegar a 280°C, manteniendo esta temperatura durante diez minutos.

Los espectros de masas fueron obtenidos dentro de un rango de masas (m/z) de 28-400 u.m.a., con un voltaje de ionización de 70 eV.

Los compuestos fueron identificados por su espectro de masas (Adams, 2007), confirmando su identidad con los índices de retención relativos a C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> *n*-alcanos (índices de Kovats, IK).

Los índices de retención de Kovats fueron calculados usando un estándar de hidrocarburos C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>, que se cromatografió cuando se analizaron las muestras. Una vez obtenidos los tiempos de retención, expresados en segundos, de cada uno de los componentes del aceite esencial, se determinó el índice de Kovats a partir de la siguiente fórmula:

$$IK = 100 * n^{\circ} C HC_{n-1} + [(\log TR X - \log TR HC_{n-1}) / (\log TR HC_{n+1} - \log TR HC_{n-1})]$$

Siendo:

n<sup>o</sup> C HC<sub>n-1</sub>: número de carbonos del hidrocarburo que tiene menor tiempo de retención que el compuesto del aceite esencial.

TR X: tiempo de retención del compuesto.

TR HC<sub>n-1</sub>: tiempo de retención del hidrocarburo anterior al compuesto.

TR HC<sub>n+1</sub>: tiempo de retención del hidrocarburo posterior al compuesto.

#### **4.4.2. Composición cuantitativa de los aceites esenciales. Cromatografía de gases.**

La cromatografía de gases fue realizada utilizando un cromatógrafo modelo Clarus 500GC Perkin-Elmer, equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna capilar de 30 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno y 0,33 μm de espesor de película.

Se usaron las mismas condiciones de trabajo que para el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.

El gas portador, fue helio a un flujo de 1 ml/ min. El FID fue mantenido a una temperatura de 250°C y el inyector a 220°C.

Junto con las muestras se cromatografió un estándar de hidrocarburos C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> para calcular posteriormente los índices de retención de Kovats, de la forma descrita en el apartado anterior, que sirvieron para la identificación de los compuestos.

#### 4.5. Uso de aceites esenciales de *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f. como inhibidores de la germinación y el crecimiento de *Araujia sericifera* Brot.

Para llevar a cabo los ensayos de actividad herbicida, se sembraron 10 semillas en placas Petri (de 9 cm de diámetro). Como sustrato se utilizaron dos discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro y 50 g/m<sup>2</sup> de espesor, situados por encima y por debajo las semillas, humedecidos con 4 ml de agua destilada.

Los aceites esenciales de *L. nobilis*, *M. communis*, *C. sinensis* y *C. lemon*, fueron añadidos a volúmenes de 0 (control con agua destilada), 0,5, 1, 2 y 4 µl, obteniéndose concentraciones de 0,125, 0,25, 0,5 y 1µl/ml respectivamente. Las placas fueron selladas con Parafilm. Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento.

De acuerdo con los ensayos previos para estudiar las condiciones óptimas de germinación de *A. sericifera*, las semillas se incubaron en cámara de cultivo F4, marca ASL, a una temperatura de 30.0 ± 0.1 °C durante 16 horas de luz y 20.0 ± 0.1 °C durante 8 horas de oscuridad.

Para evaluar la actividad herbicida de los aceites esenciales se hicieron diferentes lecturas de las placas, a los 3, 5, 7, 10 y 14 días después de poner a incubar las placas. Se registró el número de semillas germinadas y se tomaron fotografías de todas las plántulas crecidas, para posteriormente medir su longitud (coleoptilo + radícula), procesando las fotografías mediante el programa Image Tool. Cada vez que se leyeron las placas se sellaron de nuevo con Parafilm, no añadiéndose agua ni aceites a las placas durante el ensayo.



**Foto 10.** Ensayo *in vitro* de inhibición de la germinación de *A. sericifera* con aceite esencial de *L. nobilis* a concentración de 2 µl/4ml (0,5 µl/ml).

#### **4.6. Tratamiento de datos y programas de análisis.**

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1. Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos, tanto a los porcentajes de germinación, como a la longitud de las plántulas. Los porcentajes de germinación fueron transformados antes de proceder a realizar el ANOVA mediante la fórmula  $y = \arcsen \sqrt{x}$ , donde x era el porcentaje de germinación en tanto por uno, para satisfacer los requerimientos de normalidad de los datos. El ANOVA se realizó utilizando el test de comparación múltiple de Fisher (intervalos LSD, Least Significant Difference) para la separación de medias, con un nivel de confianza del 95%. Previamente se comprobó la homocedasticidad de los datos, mediante el test de Levene.

## 5. Resultados y discusión.

### 5.1. Germinación *in vitro* de semillas.

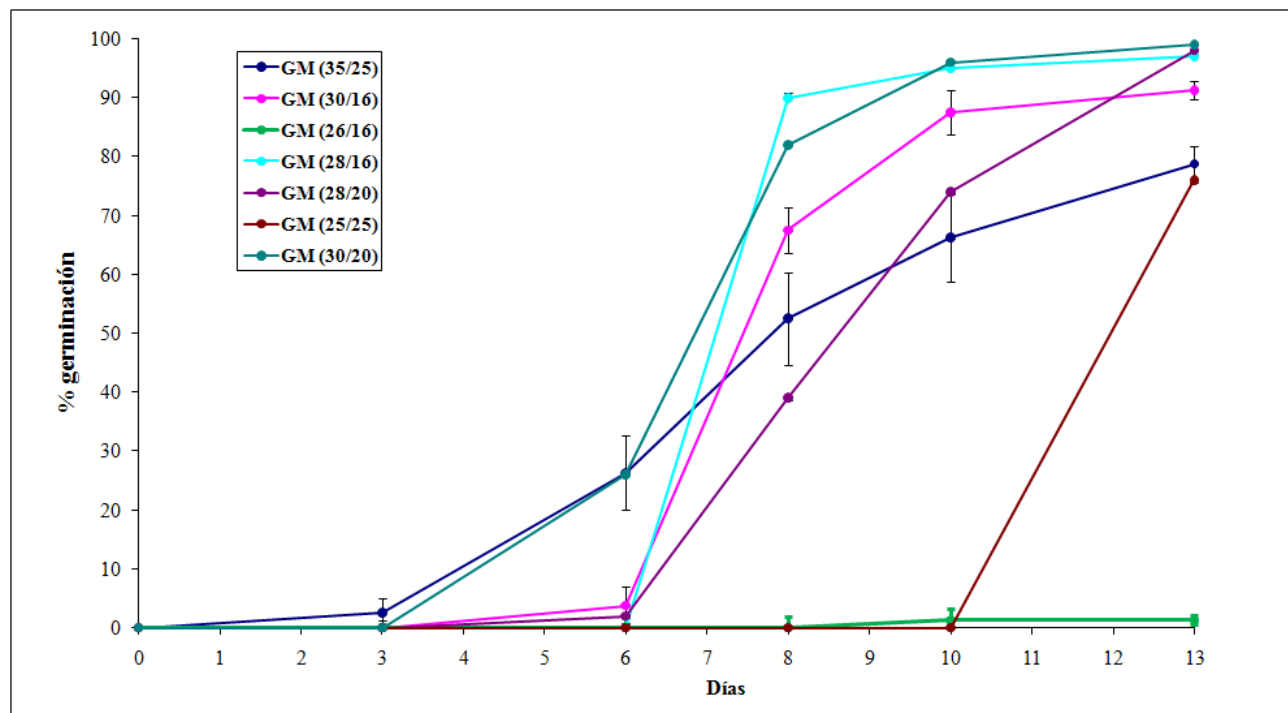
Para determinar las condiciones óptimas de germinación de *Araujia sericifera*, se probaron diferentes combinaciones de temperatura y fotoperíodo, observándose diferencias significativas entre ellas (Tabla 1). Los porcentajes de germinación más elevados se alcanzaron con el fotoperíodo 2, siendo el régimen de temperaturas más adecuado el de 30°C durante el día y 20°C durante la noche. Las condiciones con las que se obtuvieron los porcentajes de germinación más bajos, fueron las correspondientes al fotoperíodo 1, con 26°C día y 16°C noche.

**Tabla 3.** Porcentaje de germinación de *A. sericifera* para las diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura probados.

	Horas luz	Horas oscuridad	T <sup>a</sup> luz °C	T <sup>a</sup> oscuridad °C	% germinación
<b>Fotoperíodo 1</b>	14	10	35	25	78,75 ± 3,15 c
	14	10	30	16	91,25 ± 4,27 b
	14	10	26	16	1,25 ± 1,25 d
<b>Fotoperíodo 2</b>	16	8	25	25	76,00 ± 3,67 c
	16	8	30	20	99,00 ± 1,00 a
	16	8	28	20	98,00 ± 2,00 ab
	16	8	28	16	97,00 ± 2,00 ab

Los % de germinación son la media ± el error estándar de 5 repeticiones, con 10 semillas cada una, 13 días después de incubación. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad.

La germinación de *Araujia sericifera* se da a partir del día 1 para las combinaciones de temperatura de 35°C-25°C día-noche respectivamente (Figura 1), a partir del tercer día para los pares de temperaturas de 30°C-20°C, 30°C-16°C, 28°C-20°C noche-día respectivamente, a partir del sexto día en el caso de 28°C-16°C día-noche, a partir del octavo día para temperaturas de 26°C-16°C día-noche y a partir del décimo día para las temperaturas de 25°C-25°C. Con las temperaturas de 30°C-20°C, 28°C-20°C y 28°C-16°C día-noche se obtuvieron los porcentajes de germinación más elevados (99%, 98% y 97% respectivamente), no existiendo diferencias significativas entre ellas (Tabla 3). Por ello seleccionamos la temperatura de 30°C-20°C, como la óptima para realizar los ensayos alelopáticos con aceites esenciales.



**Figura 1.** Evolución de la germinación de *A. sericifera* combinando diferentes condiciones de temperatura y fotoperíodo.

## 5.2. Composición química de aceites esenciales.

Se han identificado 46 compuestos en el aceite esencial de laurel que representan el 96,87% de la composición del mismo. En la Tabla 4 se recopilan los componentes del aceite esencial por grupos químicos y ordenados según su índice de Kovats (IK).

Desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, la fracción monoterpénica tanto hidrocarbonada (15,54%) como oxigenada (60,82%) fue la más representativa siendo los componentes mayoritarios los monoterpenos oxigenados 1,8-cineol (33,13%), acetato de  $\alpha$ -terpinilo (13,02%) y linalol (8,80%). En segundo lugar cuantitativamente destaca la serie aromática con metil eugenol (12,88%) como componente mayoritario.



**Tabla 4.** Composición del aceite esencial de *Laurus nobilis*.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		
<b>15,54</b>		
$\alpha$ -tujeno	930	0,37 $\pm$ 0,02
$\alpha$ -pineno	939	2,79 $\pm$ 0,13
canfeno	956	0,09 $\pm$ 0,02
sabineno	978	6,34 $\pm$ 0,07
$\beta$ -pineno	982	2,86 $\pm$ 0,25
mirceno	992	0,54 $\pm$ 0,13
$\alpha$ -felandreno	1009	0,14 $\pm$ 0,02
$\delta$ -3-careno	1012	0,16 $\pm$ 0,02
$\alpha$ -terpineno	1021	0,36 $\pm$ 0,09
<i>p</i> -cimeno	1031	0,37 $\pm$ 0,13
<i>cis</i> -ocimene	1041	t
<i>trans</i> -ocimene	1053	0,23 $\pm$ 0,05
$\gamma$ -terpineno	1064	0,97 $\pm$ 0,20
terpinoleno	1089	0,32 $\pm$ 0,06
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		
<b>60,82</b>		
1,8-cineol	1036	33,13 $\pm$ 7,37
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1078	0,44 $\pm$ 0,02
óxido de <i>cis</i> -linalol	1084	t
hidrato de <i>trans</i> -sabinene	1099	t
linalol	1107	8,80 $\pm$ 1,90
<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	1147	t
isoborneol	1173	t
$\delta$ -terpineol	1179	0,14 $\pm$ 0,01
terpinen-4-ol	1188	3,35 $\pm$ 0,18
$\alpha$ -terpineol	1201	1,70 $\pm$ 0,21
mirtenal	1206	t
<i>cis</i> -piperitol	1221	t
nerol	1235	0,16 $\pm$ 0,01
geraniol	1262	0,08 $\pm$ 0,03
acetato de $\alpha$ -terpinilo	1356	13,02 $\pm$ 2,25
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>		
<b>1,22</b>		
$\beta$ -elemeno	1392	0,17 $\pm$ 0,05
$\beta$ -cariofileno	1423	0,60 $\pm$ 0,30
$\alpha$ -humuleno	1459	0,09 $\pm$ 0,03
$\beta$ -selineno	1492	0,18 $\pm$ 0,07
$\delta$ -cadineno	1523	0,18 $\pm$ 0,09

Continúa en la siguiente página.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>4,67</b>
hedicariol	1557	0,08 ± 0,03
nerolidol	1568	0,08 ± 0,03
espatulenol	1580	0,22 ± 0,09
óxido de cariofileno	1588	3,08 ± 1,07
viridiflorol	1592	0,10 ± 0,04
ledol	1600	0,08 ± 0,03
junenol	1616	0,23 ± 0,09
β-eudesmol	1647	0,79 ± 0,25
<b>Aromáticos</b>		<b>14,62</b>
metil chavicol	1210	t
eugenol	1364	1,02 ± 0,24
metil eugenol	1414	12,88 ± 1,79
elemicina	1561	0,71 ± 0,24
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>96,87</b>

En la Tabla 5 se recopilan por grupos químicos y ordenados según su índice de Kovats (IK) los 49 compuestos identificados en el aceite esencial de mirto. El porcentaje total de compuestos identificados fue de 94,73%.

Al igual que con la esencia anterior vuelven a ser los monoterpenos, oxigenados (74,76%) e hidrocarbonados (15,16%) la fracción mayoritaria del aceite esencial de mirto. Los componentes oxigenados principales fueron acetato de mirtenilo (24,68 %), linalol (22,27%) y 1,8-Cineol (9,97%). Entre los monoterpenos hidrocarbonados destaca α-pineno (12,88%) como componente mayoritario.

**Tabla 5.** Composición del aceite esencial de *Myrtus communis*.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		
<b>15,16</b>		
$\alpha$ -tujeno	933	t
$\alpha$ -pineno	940	12,60 $\pm$ 1,35
$\beta$ -pineno	983	0,09 $\pm$ 0,03
mirceno	993	0,61 $\pm$ 0,14
$\delta$ -3-careno	1013	0,25 $\pm$ 0,05
<i>p</i> -cimeno	1031	0,75 $\pm$ 0,10
<i>cis</i> -ocimene	1042	0,07 $\pm$ 0,05
<i>trans</i> -ocimene	1053	0,46 $\pm$ 0,02
$\gamma$ -terpineno	1064	0,17 $\pm$ 0,01
terpinoleno	1090	0,16 $\pm$ 0,01
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		
<b>74,76</b>		
1,8-cineol	1035	9,97 $\pm$ 0,31
óxido de <i>cis</i> -linalol	1078	0,10 $\pm$ 0,02
óxido de <i>trans</i> -linalol	1090	0,08 $\pm$ 0,00
linalol	1111	22,27 $\pm$ 1,55
<i>trans</i> -pinocarveol	1147	t
óxido de nerol	1153	0,12 $\pm$ 0,04
terpinen-4-ol	1174	t
<i>p</i> -cymen-8-ol	1187	0,31 $\pm$ 0,04
$\alpha$ -terpineol	1203	4,90 $\pm$ 0,46
mirtenol	1206	2,24 $\pm$ 0,29
<i>trans</i> -carveol	1224	t
$\beta$ -ciclocitral	1225	t
nerol	1235	0,34 $\pm$ 0,03
acetato de linalilo	1258	5,14 $\pm$ 1,03
acetato de <i>trans</i> -pinocarvilo	1298	0,33 $\pm$ 0,02
acetato de mirtenilo	1334	24,68 $\pm$ 2,91
acetato de <i>trans</i> -carvilo	1341	0,05 $\pm$ 0,03
acetato de $\alpha$ -terpinilo	1357	0,48 $\pm$ 0,06
acetato de nerilo	1367	0,76 $\pm$ 0,12
acetato de geranilo	1386	2,99 $\pm$ 0,24
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>		
<b>1,06</b>		
$\alpha$ -copaeno	1381	0,10 $\pm$ 0,03
$\beta$ -cariofileno	1425	0,21 $\pm$ 0,08
$\alpha$ -humuleno	1460	0,75 $\pm$ 0,19
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		
<b>0,28</b>		
óxido de cariofileno	1589	0,22 $\pm$ 0,09
epóxido de humuleno II	1606	0,06 $\pm$ 0,03

Continúa en la siguiente página.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Aromáticos</b>		<b>1,03</b>
metil chavicol	1208	t
metil eugenol	1411	0,99 ± 0,17
metil isoeugenol	1493	0,04 ± 0,02
elemicina	1561	t
<b>Otros</b>		<b>2,67</b>
2,4-dimetil-3-pentanone	785	0,03 ± 0,01
hexanal	805	0,03 ± 0,01
2-hexenal	859	0,76 ± 0,27
3-hexen-1-ol	862	0,05 ± 0,02
2-metilpropilbutanoato	918	1,27 ± 0,14
2-metilpropil-2-metil-butanoato	1006	0,13 ± 0,02
óxide de dehidroxi- <i>cis</i> -linalol	1011	0,14 ± 0,05
2-metilbutil-2-metil propanoato	1021	0,13 ± 0,04
flavesona	1547	0,13 ± 0,05
<i>iso</i> -leptospermona	1618	t
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>94,73</b>

Un total de 51 compuestos fueron identificados en el aceite esencial de naranjo, siendo clasificados también por grupos químicos y ordenados según su índice de Kovats (IK) (Tabla 6). El porcentaje total de la composición del aceite identificado fue de 99,40%.

La fracción monoterpénica hidrocarbonada (69,72%) y oxigenada (24,97%) fue la mayoritaria en el aceite esencial de naranjo. Si bien desde el punto de vista cualitativo los monoterpenos oxigenados son los más representativos, los mayores porcentajes se obtiene para los monoterpenos hidrocarbonados sabineno (30,09 %), *trans*-ocimeno (9,05%) y  $\delta$ -3-careno (8,50%). Es interesante destacar la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -sinensal, característicos del aceite esencial de naranjo y una clara ausencia de la serie aromática.

**Tabla 6.** Composición del aceite esencial de *Citrus sinensis*.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		<b>69,72</b>
$\alpha$ -tujeno	931	0,43 $\pm$ 0,08
$\alpha$ -pineno	939	1,59 $\pm$ 0,31
sabineno	980	30,09 $\pm$ 2,88
$\beta$ -pineno	983	2,07 $\pm$ 0,23
mirceno	993	4,31 $\pm$ 0,48
$\alpha$ -felandreno	1010	0,40 $\pm$ 0,05
$\delta$ -3-careno	1014	8,50 $\pm$ 2,06
$\alpha$ -terpineno	1022	1,53 $\pm$ 0,18
<i>p</i> -cimeno	1026	0,07 $\pm$ 0,01
<i>o</i> -cimeno	1031	0,56 $\pm$ 0,03
limoneno	1036	5,87 $\pm$ 0,67
<i>cis</i> -ocimeno	1042	0,32 $\pm$ 0,02
<i>trans</i> -ocimeno	1055	9,05 $\pm$ 0,66
$\gamma$ -terpineno	1065	2,85 $\pm$ 0,45
terpinoleno	1086	2,10 $\pm$ 0,09
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>24,97</b>
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1078	0,51 $\pm$ 0,08
linalol	1106	4,52 $\pm$ 1,93
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1119	t
<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	1140	0,06 $\pm$ 0,01
isopulegol	1152	0,25 $\pm$ 0,08
citronelal	1156	4,78 $\pm$ 0,46
terpinen-4-ol	1185	7,56 $\pm$ 2,23
$\alpha$ -terpineol	1201	0,57 $\pm$ 0,17
<i>cis</i> -piperitol	1205	t
<i>trans</i> -piperitol	1212	0,09 $\pm$ 0,02
citronelol	1234	0,80 $\pm$ 0,28
neral	1248	1,46 $\pm$ 0,30
geraniol	1257	0,16 $\pm$ 0,05
geranial	1277	1,87 $\pm$ 0,40
timol	1297	t
metil geranato	1329	0,49 $\pm$ 0,16
acetato de citronelilo	1356	0,66 $\pm$ 0,16
acetato de nerilo	1366	0,56 $\pm$ 0,11
acetato de geranilo	1385	0,63 $\pm$ 0,08

Continúa en la siguiente página.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>		
<b>1,73</b>		
$\beta$ -elemeno	1392	1,03 $\pm$ 0,43
$\beta$ -cariofileno	1422	0,24 $\pm$ 0,11
$\alpha$ -humuleno	1458	t
<i>trans</i> - $\beta$ -farneseno	1459	0,17 $\pm$ 0,10
bicyclogermacreno	1499	0,05 $\pm$ 0,01
germacreno A	1509	0,24 $\pm$ 0,06
$\delta$ -cadineno	1527	t
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		
<b>2,89</b>		
hedicariol	1556	0,06 $\pm$ 0,01
nerolidol	1568	0,06 $\pm$ 0,01
óxido de cariofileno	1587	0,11 $\pm$ 0,01
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1653	t
$\beta$ -sinensal	1701	2,03 $\pm$ 0,44
$\alpha$ -sinensal	1759	0,54 $\pm$ 0,06
fitol	2119	0,10 $\pm$ 0,03
<b>Otros</b>		
<b>0,09</b>		
6-metil-5-hepten-2-one	992	t
bergamal	1060	0,09 $\pm$ 0,02
<i>p</i> -vinil guaiacol	1315	t
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>99,40</b>

Un total de 34 compuestos fueron identificados en el aceite esencial de limón, siendo clasificados como en los casos anteriores por grupos químicos y ordenados por orden de elución (Tabla 7). El porcentaje total de compuestos identificados fue de 98,39%.

Al igual que en el aceite esencial de naranjo los monoterpenos hidrocarbonados (55,57%) seguidos de los oxigenados (41,50%) fueron los más representativos tanto cualitativamente como cuantitativamente. Los mayores porcentajes fueron para geraniol (25,96 %) y neral (18,71 %) entre los monoterpenos oxigenados y limoneno (25,48%) y  $\beta$ -pineno (9,45) entre los hidrocarbonados. La fracción sesquiterpénica sólo estuvo constituida por el  $\beta$ -cariofileno y su óxido.

**Tabla 7.** Composición del aceite esencial de *Citrus limon*.

<b>Compuestos</b>	<b>KI</b>	<b>% aceite</b>
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		<b>41,50</b>
$\alpha$ -tujeno	935	t
$\alpha$ -pineno	939	0,52 $\pm$ 0,08
canfeno	956	0,03 $\pm$ 0,01
sabineno	978	1,45 $\pm$ 0,09
$\beta$ -pineno	983	9,45 $\pm$ 1,25
mirceno	993	1,17 $\pm$ 0,04
$\alpha$ -felandreno	1005	t
$\delta$ -3-careno	1013	0,71 $\pm$ 0,03
<i>p</i> -cimeno	1022	0,04 $\pm$ 0,01
limoneno	1038	25,48 $\pm$ 1,02
<i>cis</i> -ocimeno	1042	0,42 $\pm$ 0,05
<i>trans</i> -ocimeno	1053	1,85 $\pm$ 0,27
$\gamma$ -terpineno	1064	0,20 $\pm$ 0,04
terpinoleno	1089	0,18 $\pm$ 0,02
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>55,57</b>
hydrato de <i>cis</i> -sabineno	1078	0,05 $\pm$ 0,00
linalol	1106	1,48 $\pm$ 0,05
óxido de <i>cis</i> -limoneno	1141	0,07 $\pm$ 0,03
óxido de <i>trans</i> -limoneno	1146	0,04 $\pm$ 0,00
citronelal	1160	1,27 $\pm$ 0,19
terpinen-4-ol	1182	t
$\alpha$ -terpineol	1187	1,15 $\pm$ 0,08
nerol	1236	1,53 $\pm$ 0,32
neral	1251	18,71 $\pm$ 0,85
geraniol	1263	25,96 $\pm$ 1,07
acetato de citronelilo	1356	0,09 $\pm$ 0,02
acetato de nerilo	1367	2,11 $\pm$ 0,11
acetato de geranilo	1386	3,07 $\pm$ 0,15
propanoato de geranilo	1476	0,05 $\pm$ 0,01
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>		<b>0,47</b>
$\beta$ -cariofileno	1422	0,47 $\pm$ 0,16
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>0,09</b>
óxido de cariofileno	1588	0,09 $\pm$ 0,02
<b>Otros</b>		<b>0,76</b>
6-metil-5-hepten-2-one	992	0,56 $\pm$ 0,40
nonanal	1110	0,13 $\pm$ 0,02
undecanal	1306	t
<i>p</i> -vinil-guaiacol	1313	0,07 $\pm$ 0,01
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>98,39</b>

En los cuatro aceites esenciales, la fracción mayoritaria es la de los monoterpenos, monoterpenos oxigenados en los aceites esenciales de laurel (60,82%), mirto (74,76%) y limón (55,57%), y monoterpenos hidrocarbonados (69,72%), en el aceite esencial de naranjo, si bien los monoterpenos oxigenados alcanzaron un 25% del mismo. Este mismo comportamiento se observa en el aceite esencial de limón con un 41,50% de monoterpenos hidrocarbonados.

La mayoría de bibliografía existente sobre la composición química de los aceites de naranjo y limón hace referencia a aceites provenientes de la corteza de los frutos (Njoroge *et al.*, 2005; Monajemi *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Khare *et al.*, 2009; Hosni *et al.* 2010), no correspondiendo los estudios encontrados, realizados sobre aceite esencial de hojas, a las variedades analizadas en este trabajo (Lota *et al.*, 2002, Baaliouamer *et al.*, 1988).

Se ha estudiado la variabilidad de la composición del aceite esencial de hojas de mirto proveniente de Portugal durante los meses de mayo a octubre (Pereira *et al.*, 2009), siendo el compuesto mayoritario en el mes de mayo, fecha más cercana a la de obtención de nuestro aceite, el acetato de mirtenilo (37,62±0,13), seguido de una mezcla de limoneno y 1,8-cineole (20,03±0,11), conteniendo también cantidades importantes de  $\alpha$ -pinene (10,38±0,07) y linalol (7,58±0,06). El aceite de mirto analizado en este trabajo coincide en cuanto al componente mayoritario, pero no contiene limoneno, siendo el segundo compuesto en importancia el linalol (22,27 ±1,55), seguido de  $\alpha$ -pinene (10,38±0,07) y 1,8-cineole (9,97±0,31), también presentes en el aceite procedente de Portugal. La composición del aceite de hojas de mirto también ha sido estudiada en muestras procedentes de Chipre (Akin *et al.*, 2010), pero en este caso la composición es muy diferente a las muestras de España, ya que el componente mayoritario es 1,8-cineol (50,13%), seguido de linalol (12,65%) y  $\alpha$ -terpineol (7,57%), y sobre todo sin presencia de acetato de mirtenilo.

La composición del aceite esencial de hojas de laurel ha sido ampliamente estudiada por otros autores, siendo 1,8-cineol el componente mayoritario de aceites esenciales de laurel provenientes de Marruecos (Derwich *et al.*, 2009), Turquía (Ozcan *et al.*, 2005; Dadalioglu *et al.*, 2004; Kilic *et al.*, 2005;), China (Zheng-kui *et al.*, 1990), Túnez (Bouzouita *et al.*, 2001), Croacia-Serbia (Politeo *et al.*, 2007; Simic *et al.*, 2004) e Italia (Flamini *et al.*, 2007). Este compuesto también ha sido el mayoritario en el aceite de laurel obtenido en este trabajo (33,13±7,37). Sin embargo no sucede lo mismo con el resto de componentes mayoritarios, que varían notablemente dependiendo de la procedencia del material vegetal: sabineno fue el segundo compuesto en importancia (14,05%) del aceite esencial de laurel procedente de Antakya, Irán (Verdian-Rizi, 2009), seguido de acetato de  $\alpha$ -terpinilo (11,94%) y  $\alpha$ -terpineol (6,83%), mientras que en el aceite esencial proveniente de Marruecos (Derwich *et al.*, 2009) los mayores porcentajes después de 1,8-cineol fueron para acetato



de  $\alpha$ -terpinilo (8,96%) y limoneno (5,25%). Los componente mayoritarios que siguieron al 1,8-cineol en el aceite de laurel objeto de nuestro estudio (material vegetal procedente de Moncada, Valencia) fueron acetato de  $\alpha$ -terpinilo ( $13,02 \pm 2,25$ ) y metil eugenol ( $12,88 \pm 1,79$ ).

### 5.3. Estudio del poder alelopático de los aceites esenciales.

#### 5.3.1. Test de germinación.

El aceite esencial de limón fue el más efectivo (Tabla 8), inhibiendo totalmente la germinación de la arvense, aplicado en concentraciones de 0,250, 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$ , consiguiendo para la concentración de 0,125  $\mu\text{l/ml}$  una inhibición de la germinación del 93%, habiendo diferencias significativas entre el control y esta concentración.

El naranjo fue el segundo aceite que mejores resultados obtuvo, inhibiendo la germinación en un rango del 91 al 93% en concentraciones de 0,250, 0,5 y 1  $\mu\text{l/m}$ , no habiendo diferencias significativas entre ellas, pero sí con el control y la dosis de 0,125  $\mu\text{l/ml}$  (75% de inhibición).

El tercer aceite con mayor poder de inhibición fue el de mirto donde las concentraciones de 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$ , redujeron la germinación un 82%-85%, y un 50-55% las concentraciones de 0,125 y 0,250  $\mu\text{l/ml}$ , siendo significativamente diferentes las concentraciones 0,5-1  $\mu\text{l/ml}$ , 0,125-0,250  $\mu\text{l/ml}$  y el control.

El aceite esencial de laurel fue el menos efectivo contra la germinación de *Araujia sericifera*, inhibiendo a concentraciones de 0,250, 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$  un rango entre el 39-44%, sin haber diferencias significativas entre ellas, mientras que la concentración de 0,125  $\mu\text{l/ml}$  no tuvo efecto.

**Tabla 8.** Porcentajes de germinación de semillas de *Araujia sericifera* tratadas con aceites de naranjo, laurel, mirto y limón.

TRATAMIENTO	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Myrtus communis</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus limon</i>
0 (control)	96,0 $\pm$ 2,2 a	99,0 $\pm$ 1,0 a	99,0 $\pm$ 1,0 a	99,0 $\pm$ 1,0 a
0,125 $\mu\text{l/ml}$	93,0 $\pm$ 3,0 a	45,0 $\pm$ 11,2 b	25,0 $\pm$ 7,8 b	7,0 $\pm$ 3,3 b
0,250 $\mu\text{l/ml}$	54,0 $\pm$ 11,3 b	50,0 $\pm$ 10,6 b	9,0 $\pm$ 2,8 c	0,0 $\pm$ 0,0
0,5 $\mu\text{l/ml}$	59,0 $\pm$ 11,5 b	18,0 $\pm$ 8,1 c	11,0 $\pm$ 3,5 c	0,0 $\pm$ 0,0
1 $\mu\text{l/ml}$	54,0 $\pm$ 8,2 b	15,0 $\pm$ 9,3 c	7,0 $\pm$ 3,0 c	0,0 $\pm$ 0,0

Los valores son la media  $\pm$  el error estándar de 10 repeticiones, con 10 semillas cada una, 14 días después de incubación. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad.

### 5.3.2. Crecimiento de las semillas de *Araujia sericifera* Brot.

En las figuras 2 a 5 se representa el crecimiento de plántulas de *Araujia sericifera* tratadas con aceites de laurel, mirto, naranjo y limón durante 14 días.

El aceite esencial de limón fue el más fitotóxico, inhibiendo totalmente el crecimiento de la arvense a las concentraciones de 0,250, 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$ , y reduciendo el crecimiento en un 94% a la concentración de 0,125  $\mu\text{l/ml}$  (Tabla 9).

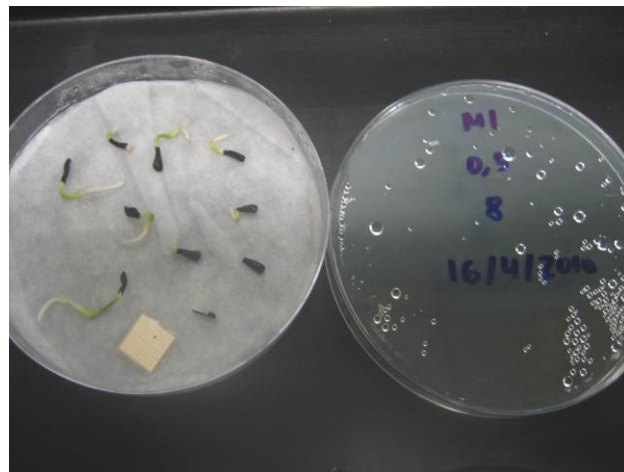
El siguiente aceite más activo en la inhibición del crecimiento fue el mirto, consiguiendo una reducción de alrededor del 99% a concentraciones de 0,5 y 1  $\mu\text{l/m}$ , y del 74-81% a concentraciones de 0,125 y 0,250  $\mu\text{l/m}$  (Tabla 9). Al realizar el estudio estadístico de los resultados obtenidos con este aceite, para las concentraciones de 0,5 y 1  $\mu\text{l/m}$ , tanto las medias de la longitud de las plántulas, como las desviaciones estándar dan muy cercanas a cero, siendo mucho menores que las del resto de tratamientos, por lo que no se incluyeron al hacer el ANOVA, ya que no se cumplía la hipótesis de homocedasticidad, pero claramente se muestra un fuerte efecto inhibitorio del aceite a estas concentraciones.

El tercer aceite con mayor poder de inhibición del crecimiento fue el de naranjo, logrando una inhibición del 90-96% a las concentraciones de 0,250, 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$  (sin diferencias significativas entre ellas), y del 73% a la concentración de 0.125  $\mu\text{l/ml}$ , siendo las diferencias significativas con el control (Tabla 9).

El aceite de laurel fue el menos efectivo contra el crecimiento de plántulas de *Araujia sericifera*, reduciendo el crecimiento un 68% a concentraciones de 0,250, 0,5 y 1  $\mu\text{l/ml}$  sin haber diferencias significativas entre ellas (Tabla 9).



**Foto 11.** Placa control n° 10 día 14. Ensayo de inhibición del crecimiento de *A. sericifera* con aceites esenciales de naranjo, limón, mirto y laurel.

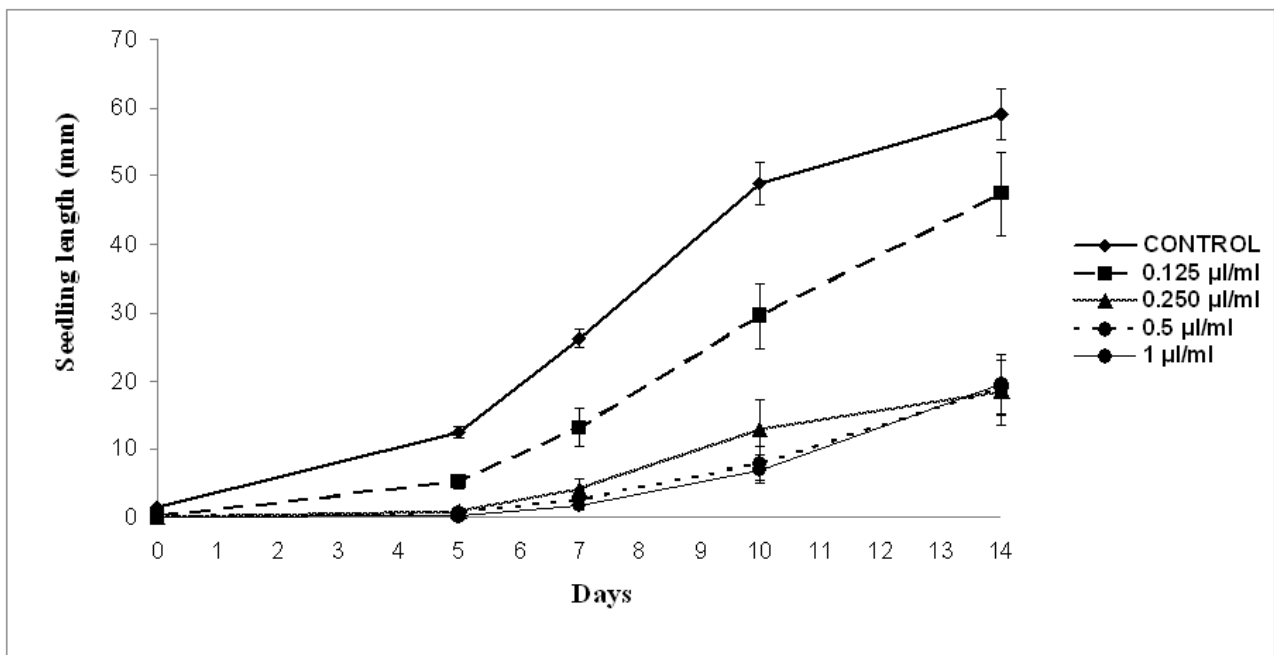


**Foto 12.** Placa *A. sericifera* tratada con aceite de mirto 0,5  $\mu\text{l}/4\text{ml}$  (0,125  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ).

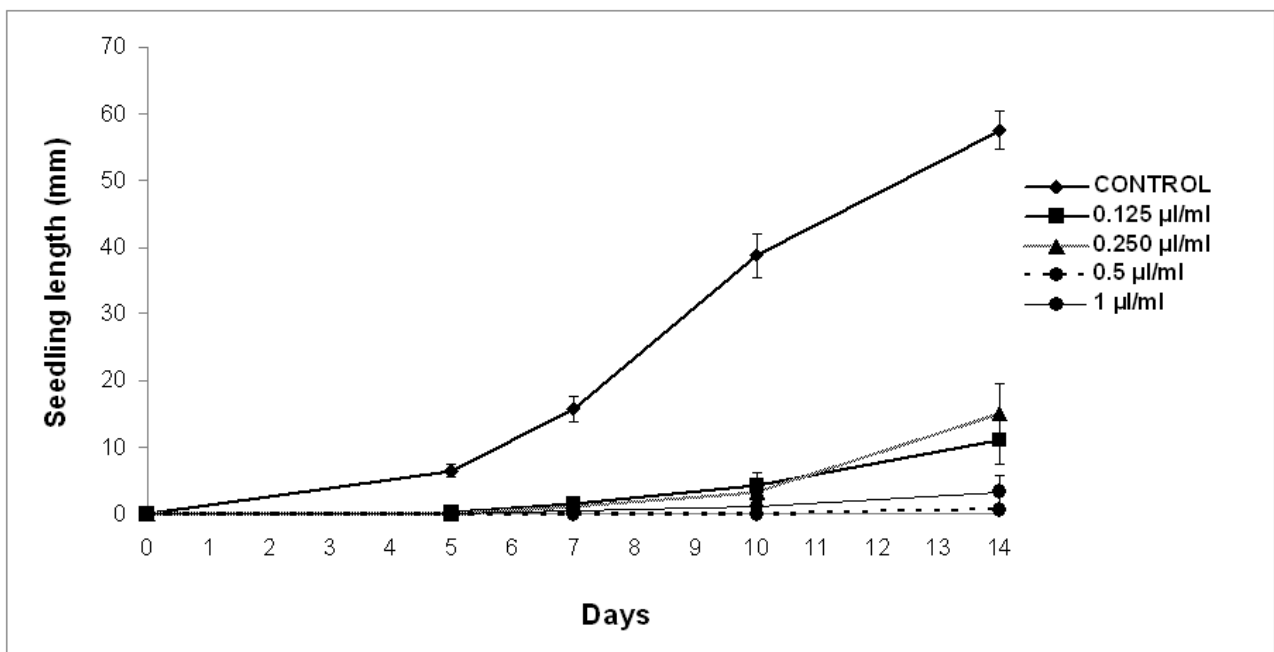
**Tabla 9.** Longitud (mm) de plántulas de *Araujia sericifera* tratadas con aceites esenciales de naranjo, laurel, mirto y limón a los 14 días tras realizar los tratamientos (registro final del ensayo).

TRATAMIENTO	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Myrtus communis</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus limon</i>
<b>0 (control)</b>	59,05 $\pm$ 3,78 a	57,44 $\pm$ 2,93 a	57,44 $\pm$ 2,93 a	57,44 $\pm$ 2,93 a
<b>0,125 <math>\mu\text{l}/\text{ml}</math></b>	47,46 $\pm$ 6,22 a	11,18 $\pm$ 3,68 b	15,89 $\pm$ 2,39 b	3,58 $\pm$ 2,18 b
<b>0,250 <math>\mu\text{l}/\text{ml}</math></b>	18,68 $\pm$ 5,18 b	15,21 $\pm$ 4,42 b	5,74 $\pm$ 2,18 c	0,0 $\pm$ 0,0
<b>0,5 <math>\mu\text{l}/\text{ml}</math></b>	19,01 $\pm$ 4,05 b	0,75 $\pm$ 0,64	7,99 $\pm$ 2,91 c	0,0 $\pm$ 0,0
<b>1 <math>\mu\text{l}/\text{ml}</math></b>	19,46 $\pm$ 4,41 b	0,17 $\pm$ 0,17	2,34 $\pm$ 1,43 c	0,0 $\pm$ 0,0

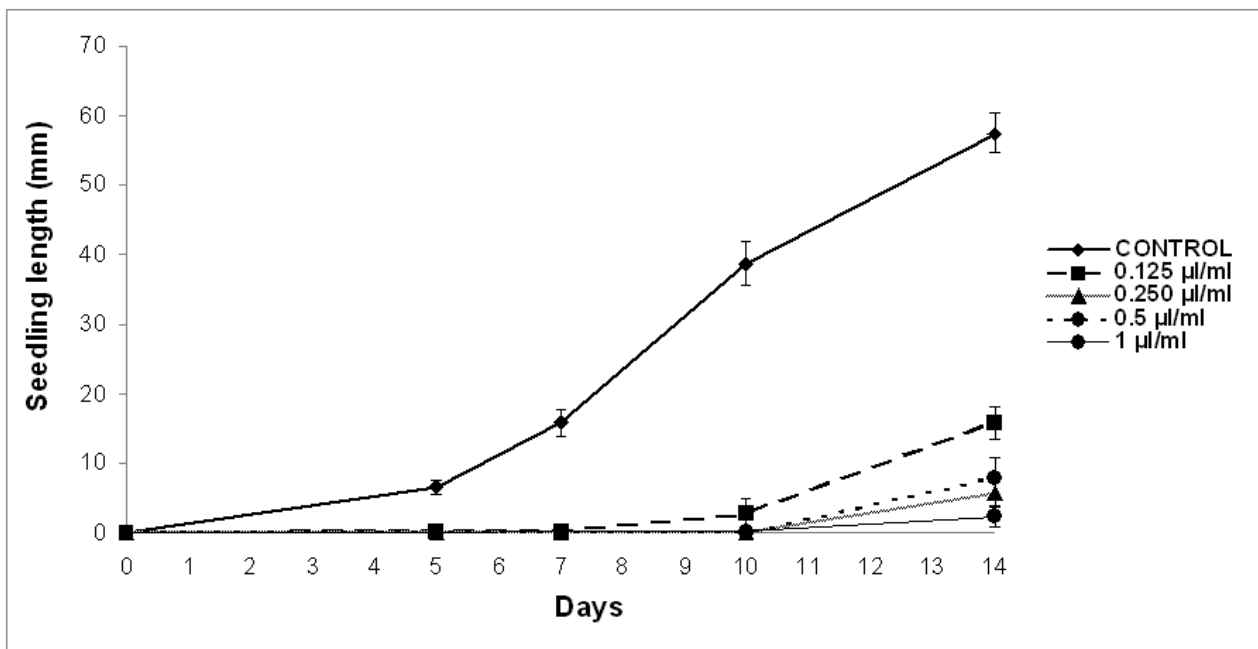
Los valores son la media  $\pm$  el error estándar de 10 repeticiones, con 10 semillas cada una, 14 días después de incubación. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de probabilidad.



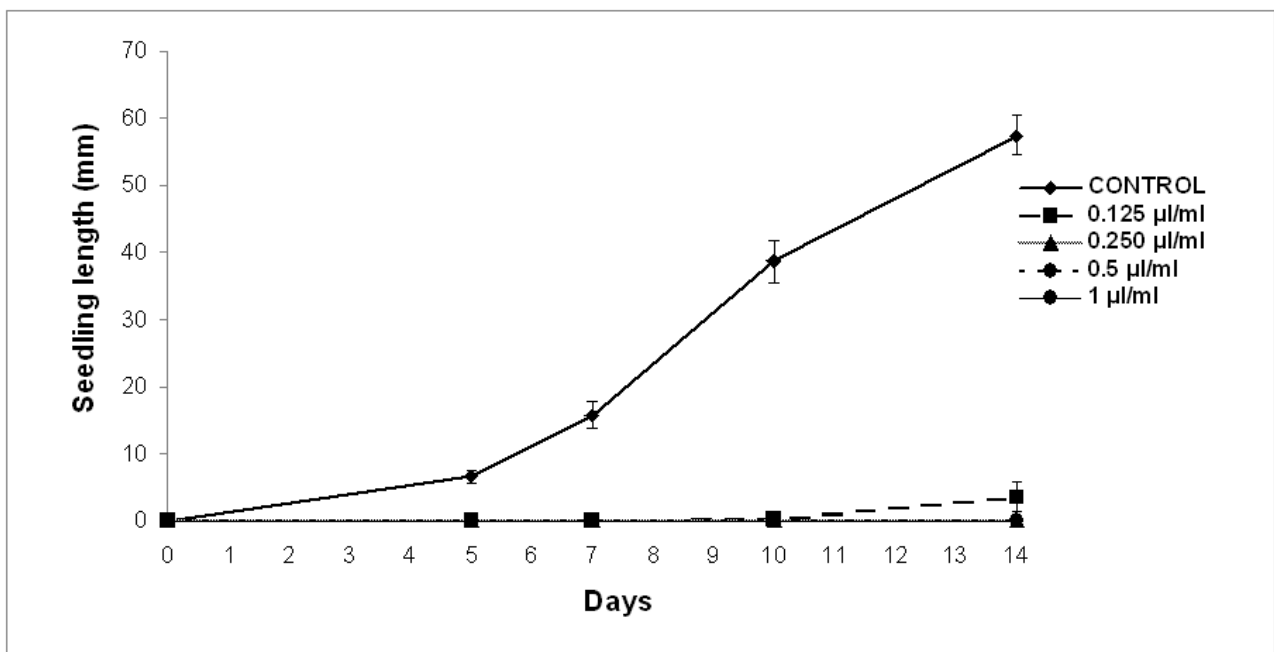
**Figura 2.** Crecimiento de plántulas de *A. sericifera* tratadas con aceite esencial de *Laurus nobilis* a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml.



**Figura 3.** Crecimiento de plántulas de *A. sericifera* tratadas con aceite esencial de *Myrtus communis* a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml.



**Figura 4.** Crecimiento de semillas de *A. sericifera* tratada con aceite esencial de *Citrus sinensis* a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml.



**Figura 5.** Crecimiento de semillas de *A. sericifera* tratada con aceite esencial de *Citrus limon* a las concentraciones de 0,125, 0,25, 0,50 y 1 µl/ml.

Se ha corroborado que los aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas de las familias Labiadas, Compuestas, Mirtáceas y Verbenáceas, tienen propiedades alelopáticas (Dudai *et al.*, 1999, Angelini *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los cuatro aceites esenciales utilizados tienen efectos fitotóxicos en mayor o menor grado sobre *Araujia sericifera*. Cabe destacar que de las dos especies de Mirtáceas estudiadas (*Laurus nobilis* y *Mirtus communis*), el aceite esencial de *Mirtus communis* ha logrado un efecto mayor en el control de la arvense, a pesar de que el compuesto mayoritario presente en el aceite de laurel era el 1,8-cineol, que ha demostrado, en estudios de campo, ser uno de los más potentes aleloquímicos emitidos por algunas especies de *Artemisia* y *Eucalyptus*, y también está presente en aceites esenciales de *Salvia* (Halligan, 1975; Kumar y Moto, 1986). Sin embargo Angelini *et al.* 2003 verificaron que el 1,8-Cineol no tenía efecto significativo sobre la germinación de algunos cultivos y especies arvenses. Otros estudios de campo indican también que el 1,8-cineol tiene baja actividad herbicida Halligan, 1975; Heisey, 1984). Barton *et al* (2010) comprobaron que derivados hidroxilo y ester del 1,8-cineol y 1,4-cineol, tenían actividad herbicida contra *Lolium multiflorum* y *Raphanus sativus*, apuntando que la fitotoxicidad del 1,8-cineol puede deberse a la hidrólisis de los ésteres que se producen cuando las plantas lo asimilan para producir hidroxycineol y ácido carboxílico (Allan *et al.*, 2010).

Los aceites más efectivos en el control de la germinación de *Araujia sericifera* fueron los de limón y naranja. Estos aceites podrían tener un potencial como herbicidas naturales, de hecho se está patentando un herbicida a base de aceites de pino y de cítricos (Selga *et al.*, 1997). Ensayos de campo y una adecuada formulación de los aceites para dotarlos de estabilidad, serían necesarios para poder aplicarlos como herbicidas naturales.

## **6. Conclusiones.**

- De las condiciones de temperatura y fotoperíodo estudiadas, las óptimas para la germinación de *Araujia sericifera* son 16 horas luz a 30°C y 8 horas oscuridad a 20°C.
- En cuanto al control de *Araujia sericifera*, el aceite más efectivo en la inhibición de la germinación fue el de limón, seguido del de naranjo, mirto y por último laurel. En la inhibición del crecimiento de las plántulas, el mayor efecto se consiguió nuevamente con el aceite de limón, seguido de naranjo, mirto y laurel.
- Los aceites de naranjo y limón muestran un gran potencial como posibles herbicidas naturales para el control de *Araujia sericifera*.

## 7. Bibliografía.

ABBASDOKHT H. (2008). The effect of plant residual on establishment of crops. 6th International meeting on soil fertility land management and agroclimatology, Kusadasi, Turkey, october 29-november 1, 121-124.

ADAMS R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation.

ALVES P.L.C.A., TOLEDO R.E.B., GUSMAN A.B. (1999). Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp., in: Narwal, S.S. (Ed.), Allelopathy Update, volume 2, Basic and Applied Aspects, Science Publishers Incorporation, Enfield, New Hampshire, USA, 131–148.

AHMAD M.M., SALIM-UR-REHMAN, IQBAL Z., ANJUMJ F.M., SULTAN J.I. (2006). Genetic variability to essential oil composition in four *citrus* fruit species. Pakistan Journal of Botany 38, 319-324.

ARMIRANTE F., DE FALCO E., DE FEO V., DE MARTINO L., MANCINI, E., QUARANTA E. (2006). Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean *Labiatae*. Acta Horticulturae 723, 347-352.

AKIN M., AKTUMSEK A., NOSTRO A. (2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Myrtus communis* L. growing in northern Cyprus. African Journal of Biotechnology 9 (4), 531-535.

ANGELINI L., CARPANESE G., CIONI P.L., MORELLI I., MACCHIA M., FLAMINI G. (2003). Essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* and leed germination inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6158-6164.

AGUSTÍ M. (2003). Citricultura. Mundi-Prensa, Madrid, España, 357-358.

BAGAVATHY S., SAHAYA X.G. (2007). Effects of aqueous extract of *Eucalyptus globulus* on germination and seedling growth of sorghum. Allelopathy Journal 20 (2), 395-401.



BANSAL G.L. (1998). Allelopathic effect of *Lantana camara* on rice and associated weeds under the midhill conditions of Himachal Pradesh, India, in: Olofsdotter, M., (Ed.), Allelopathy in Rice. Proceedings of the Workshop on Allelopathy in Rice, 25–27 november 1996. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 133–138.

BARTON A.F.M., DELL B., KNIGHT A.R. (2010). Herbicidal activity of cineole derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10147-10155.

BLANCO Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos tropicales* 27 (3), 5-16.

BLÁZQUEZ M.A., ZAFRA POLO M.C. (2010). Material didáctico Farmacognosia. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Reproexpres, Valencia, España, 101-113.

BOIRA H., CARRETERO J.L. (1992). Aspectos ecológicos de la vegetación arvense de los cítricos. *Actas del Congreso 1992 de la Sociedad Española de Malherbología*, 99-104.

BOUZOUITA N., NAFTI A., CHAABOUNI M., LOGNAY G., MARLIER M., ZGHOULLI S., THONART P. (2001). Chemical compositions of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research* 13, 116-117.

BRUNETON J. (1991). Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Acribia, Zaragoza, España, 223-230.

BUCCIARELLI A., CAMBI V.N., VILLAMIL C.B. (2002). Morphoanatomical characters of *Araujia hortorum* E. Fourn (*Asclepiadaceae*), a native species of medicinal interest. *International Journal of Experimental Botany* 77, 283-295.

CALLAWAY R.M., RIDENOUR W.M. (2004). Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and Environment* 2, 436-443.

CALLAWAY R.M., RIDENOUR W.M., LABOSKI T., WEIR T., VIVANCO J.M. (2005). Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. *Journal of Ecology* 93, 576-583.

CARBALLEIRA A., REIGOSA M.J. (1999). Effects of natural leachates of *Acacia dealbata* Link. in Galicia (NW Spain). Botanical Bulletin of Academia Sinica 40, 87-92.

CARRETERO J.L. (1994). La flora arvense de los cítricos españoles. Phytoma 63, 19.

COSTA M., MORLA C. (1989). Algunos taxones de interés en el NW de la Península Ibérica. Botánica Complutenses 14, 185-192.

CULPEPER N. (1633). English Physitian and Complete Herball. Foulsham, London, United Kingdom (Reprinted 1995).

DADALIOGLU I., EVRENDILEK G. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 8255- 8260.

DAYAN F., ROMAGNI J., TELLEZ M., RIMANDO A., DUKE S. (1999). Managing weeds with natural products. Pesticide Outlook 5, 185-188.

DE CANDOLLE M.A.P. (1832). Physiologie Végétale, Tome III, Béchét Jeune, Librería de la Facultad de Medicina., Paris, Francia, 1474-1475.

DERWICH E., BENZIANE Z., BOUKIR A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3 (4), 3818-3824.

DUDAI N., POLJAKOFF-MAYBER A., MAYER A.M., PUTIEVSKY E., LERNER H.R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. Journal of Chemical Ecology 25, 1079-1089.

DUDAI N., BEN-AMI M., CHAIMOVICH R., CHAIMOVITSH D. (2004). Essential oils as allelopathic agents: bioconversion of monoterpenes by germinating wheat seeds. Acta Horticulturae 629, 505-508.

DUKE S. O., DAYAN F. E., RIMANDO A. M., SCHRADER K. K., ALIOTTA G., OLIVA A., ROMAGNI J. G. (2002). Chemicals from nature for weed management. *Weed Science* 50, 138-151.

EINHELLING F.A. (1995). Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy, in: *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*. Inderjit K., Dakshini M.M. and Einhellig F.A. (Eds.). American Chemical Society, Washington D.C., USA, 96-116.

ENS E.J., FRENCH K., BREMNER J.B., KORTH J. (2010). Novel technique shows different hydrophobic chemical signatures of exotic and indigenous plant soils with similar effects of extracts on indigenous species seedling growth. *Plant and Soil* 326, 403-414.

EVANARI M. (1949). Germination inhibitors. *Botanical Review* 15, 153.

FLAMINI G., TEBANO M., CIONI P., CECCARINI L., SIMONE S., LONGO I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven. *Journal Chromatography A* 1143, 36-40.

GAIG P., GÁZQUEZ V., LOMBARDELO M., BOTEY E., GARCÍA-ORTEGA P. (2005). Moth plant *Araujia sericifera* Brot. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 60 (8), 1092-1093.

GRESSEL J. (2009). Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science* 65, 1164–1173.

GÓMEZ DE BARREDA A. (1976). *Araujia sericifera* Brot., mala hierba trepadora en los agrios españoles. *Levante Agrícola* 205, 13-15.

GOODWIN T.W. (1971). *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Londres, United Kingdom.

HADACEK F. (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 21, 273-322.

HALLIGAN J. P. (1975). Toxic terpenes from *Artemisia californica*. *Ecology* 56, 999-1003.

HEISEY R. M., DELWICHE C.C. (1984). Phytotoxic volatiles from *Trichostema lanceolatum*. *American Journal of Botany* 71, 821-828.

KARIM H., NESRINE Z., RAOUF C., INES A., Wafa M., MONEM K., NADIA B.B., HOUCINE S. (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry* 123, 1098-1104.

KUMAR N., MOTTO M. G. (1986). Volatile constituents of peony flowers. *Phytochemistry* 3, 663-671.

INDERJIT, STREIBIG J.C., OLOFSDOTTER M. (2002). Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. *Physiologia Plantarum* 114 (3), 422-428.

INDERJIT, DUKE S.O. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217, 529-539.

INDERJIT, RAGAN M. CALLAWAY. (2003). Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant and Soil* 256, 1-11.

JARCHOW M.E., COOK B.J. (2009). Allelopathy as mechanism for the invasion of *Typha angustifolia*. *Plant Ecology* 204, 113-124.

KHALID S., AHMAD T., SHAD A. (2002). Use of Allelopathy in agriculture. *Asian Journal of Plant Sciences* 1 (3), 292-297.

KHARE P., YADAV A., GARG S.N., KHANUJA S.P.S. (2009). Volatile constituents of *Citrus sinensis* L. (sweet orange) and *Citrus limon* L. (lemon) peels oil of Indian origin. *Indian Perfumer* 53 (2), 21-23.

KILIC A., ALTUNTAS E. (2005). Wood and bark volatile compounds of *Laurus nobilis* Original Arbeiten. Springer Verlage 2, 145-157.

KILIC A., KOLLMANNBERGER H., NITZ S. (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2231-2235.

KROPFF M.J., CHILTON W.S. (2000). *Weed Research* 40, 7-10.

LIEBMAN M., OHNO T. (1997). Crop rotation and legume residue effects on weed emergence and growth: application for weed management, in: Hatfield J.L., Buhler D. O., Stewart B.A. (Eds.), *Integrated Weed and Soil Management*, Ann Arbor Press, Michigan, USA, 181-221.

LORENZO P., PAZOS-MALVIDO E., GONZÁLEZ L., REIGOSA M.J. (2008). Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata*: physiological effects. *Allelopathy Journal* 22 (2), 64-76.

LORENZO P., GONZÁLEZ L. (2010). Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas* 19 (1), 19-91.

LOPES S.A., MARCUSSI S., TORRES S.C.Z., SOUZA V., FAGAN C., FRANCA S.C., FERNANDES N.G., LOPES J.R.S. (2003). Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strain of *Xylella fastidiosa* in Brasil. *Plant Disease* 87, 544-549.

LOTA M.L., DE ROCCA D., TOMI F.L. JACQUEMOND C., CASANOVA J. (2002). Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 796-805.

LOVETT J., RYUNTYU M. (1992). Allelopathy: broadening the context, in: Rizvi S.J.H., Rizvi V. (Eds.). *Allelopathy, Basic and Applied Aspects*. Chapman & Hall, London, United Kingdom, 11-19.

MACÍAS, F.A. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models, in: *Allelopathy: Organisms, Processes and Application*. Inderjit K., Dakshini M.M. and Einhellig F.A. (Eds.). American Chemical Society, Washington D.C., USA, 310-329.

MACÍAS F. A., MARÍN D., OLIVEROS-BASTIDA A., VARELA R. M., SIMONET A. M., CARRERA C., MOLINILLO J. M. G. (2003). Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Sciences in Space* 17 (1), 18-23.

MACÍAS F.A., CHINCHILLA N., GALINDO J. L. G., CARRERA C., MARÍN D., GARCÍA-DÍAZ M. D., SÁNCHEZ P., ARROYO E., MERA E. Y., PANDO E., GALINDO J. C. G. (2007). Nuevos retos en la agricultura, la alelopatía. Grupo de alelopatía, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz. Dossier Sanidad Vegetal, 24-29.

MALLIK A.U. (2000). Challenges and opportunities in allelopathy research: a brief overview. *Journal of Chemical Ecology* 26 (9), 2007-2009.

MAS M. T., VERDÚ A. M. C. (2005). Biodiversidad de la flora arvense en cultivos de mandarina según el manejo del suelo en las interfilas. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 31, 231-241.

MAY F.E., ASH J.E. (1990). An assessment of the allelopathic potential of *Eucalyptus*. *Australian Journal Botany* 38, 245–254.

MOLISCH H. (1937). *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie*. Fischer, Jena, Deutschland.

MONAJEMI R., ORYAN S., HAERI-ROOHANI A., GHANNADI A., JAFARIAN A. (2005). Cytotoxic effects of essential oils of some Iranian *Citrus* peels. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 3: 183-187.

MÜLLER C.H., MÜLLER W.H., HAINES B.L. (1964). Volatile growth inhibitors produced by shrubs. *Science* 143, 471-473.

MÜLLER, C. (2009). Role of glucosinolates in plant invasiveness. *Phytochemistry Reviews* 8, 227-242.

NJOROGE S.M., KOAZE H., KARANJA P.N., SAWAMURA M. (2005). Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour and Fragrance Journal* 20, 80–85.

OLIVEROS-BASTIDA A. (2008). El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Química viva* 7 (1), 2-34.

LOUDHIA, P. (1999). Allelopathic effects of *Lantana camara* L. on germination of soybean. *Legume Research* 22, 273–274.

LOUDHIA P., TRIPATHI R.S. (1999). Allelopathic effect of *Lantana camara* L. on rice. *Agricultural Science Digest* 19, 43–45.

LOUDHIA P., TRIPATHI R.S., (2000). Allelopathic effect of *Lantana camara* L. on wheat var. *sujata*. *Crop Research* 19, 357–360.

OZCAN M., CHALCHAT J. (2005). Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of bay (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food* 8, 408-411.

PATTERSON, D.T. (1985). *Weed Physiology*. Duke, S.O. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 1, 101-209.

PEREIRA P.C., CEBOLA M.-J., BERNARDO-GIL M.G. (2009). Evolution of the yields and composition of essential oil from Portuguese myrtle (*Myrtus comunis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules* 14, 3094-3105.

PINILLA C., GARCÍA J. (2002). Manejo integrado de arvenses en plantaciones de banano (*Musa AAA*). *Memorias de la XV Reunión de la Asociación de Bananeros de Colombia*. Cartagena, Colombia, 222-235.

PLINIUS SECUNDUS C. (1 A.D.). *Natural History*, 10 Vols. English Translation by Rackam H., Jones W.H.S, Eichholz D. E., Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1938-1963.

POLITEO O., JUKIC M., MILOS M. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from bay (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil. *Croatia Chemica Acta* 80, 121-126.

PUENTE M., TORRES S., FAJARDO C.E., RODRÍGUEZ M., CORONA C. (2003). Efecto alelopático de extractos acuosos de girasol (*Helianthus annuus* L.), sobre la germinación y desarrollo de malezas bajo diferentes condiciones climáticas. Centro agrícola 30 (1), 32-36.

PUJADAS A.J., LORA A., HERNÁNDEZ J.E. (1997). Flora arvense y ruderal de origen americano en los ecosistemas del sur de la península Ibérica: provincia de Córdoba. Actas etnobotánicas 92, 471-478.

PUTMAN A.R. (1985). The Chemistry of Allelopathy: Biochemical interactions between plants. American Chemistry Society, Washington D.C., USA.

RICE E. L. (1984). Allelopathy. 2 ed. Academic Press, London, United Kingdom.

RICE E., PANCHOLY. (1973). Inhibition of nitrification by climax ecosystems. American Journal of Botany 60, 691.

RÍOS S., CRESPO M.B., ALCARAZ F., SOLANAS J.L. (1999). Fenología de dos comunidades arvenses en los huertos tradicionales de cítricos del Levante español. Actas del Congreso 1999 de la Sociedad Española de Malherbología, 59-64.

RIZVI S.J.H., HAQUE H., SINGH V.K., RIZVI V. (1992). A discipline called allelopathy, in: Rizvi S.J.H., Rizvi V. (Eds.), Allelopathy: Basic and applied aspects, Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1-10.

ROY B., POPAY I., CHAMPION P., JAMES T., RAHMAN A. (2004). An illustrated guide to common weeds of New Zealand. Second Edition. New Zealand Plant Protection Society, Lincoln, New Zealand, 314.

SAMPIETRO D.A. (2002). Alelopatía: hipertextos del Área de la Biología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

<http://www.biologia.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>

SANZ ELORZA M., DANA SÁNCHEZ E.D., SOBRINO VESPERINAS E. (2004). Atlas de las Plantas Alóctonas Invasoras en España. Dirección General para la Biodiversidad. Madrid, 80-81.



SCHREINER O., REED H.S. (1908). The toxic actions of certain organic plant constituents. *Botanical Gazette* (Chicago) 45, 73-102.

SELGA J., KIELY W.A. (1997). Patent: Herbicidal composition and method. Publication number: WO9716975 (A1).

SIMIC A., SOKOVIC M., RISTIC M., GRUJIC-JOVANOVIC S., VUKOJEVIC J., MARIN P. (2004). The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research* 1, 713-717.

SISODIA S., SIDDIQUI M. B. (2010). Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of *Croton bonplandianum* Baill. on some crop and weed plants. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 2 (1), 22-28.

SOBRINO E., SANZ-ELORZA M., D. DANA E., TANARRO A. (2002). Malas hierbas alóctonas en España: importancia y comportamiento. *Revista Vida Rural* 161, 40-44.

STACHON W.J., ZIMDAHL R.L. (1980). Allelopathic activity of Canada thistle (*Cirsium arvense*) in Colorado. *Weed Science* 28 (1), 83-86.

THARAYIL N. (2009). To survive or to slay. *Plant Signaling and Behavior* 4(7), 580-583.

THEOPHRASTUS (ca 300 B.C.). *Enquiry into Plants and Minor Works on Odours and Weather Signs*, 2 Volumes, Translation to English by Hort A., Heinemann, W., London, United Kingdom, 1916.

TOMINAGA T., WATANABE O. (1997). Weed growth suppression by cogongrass (*Imperata cylindrica*) leaves. *Journal of Weed Science and Technology* 42 (3), 289-293.

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. Flora arvense de Navarra. Herbario de la Universidad pública de Navarra.

<http://www.unavarra.es/servicio/herbario/htm/inicio.htm>

VASILAKOGLU I., DHIMA K., WOGIATZI E., ELEFTHEROHORINOS I, LITHOURGIDIS A. (2007). Herbicidal potential of essential oils of oregano or marjoram (*Organium spp.*) and basil (*Ocimum basilicum*) on *Echinochloa crus galli* (L.) P. Beauv. and *Chenopodium album* L. weeds. *Allelopathy Journal* 20 (2), 297-306.

VERDEGUER M., BLÁZQUEZ M.A., BOIRA H. (2009). Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology* 37, 362-369.

VERDIAN-RIZI M. (2009). Variation in the essential oil composition of *Laurus nobilis* L. of different growth stages cultivated in Iran. *Journal of Basic and Applied Sciences* 5 (1), 33.36.

VYVYAN J.R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58, 1631-1646.

WAIPARA N.W., WINKS C.J., GIANOTTI A.F., VILLAMIL C.B., VILLAMIL S.C., DELHEY R., KIEHR M., TRAVERSA M.G., CARPINTERO D.L. (2006). Surveys for potencial biocontrol agents for moth plant in New Zealand and Argentina. *New Zealand Plant Protection Society* 59, 18-22.

WEBB C.J., SYKES W.R., GARNOCK-JONES P.J. (1988). *Flora of New Zealand, Volume IV, Naturalised Pteridophytes, Gymnosperms, Dicotyledons*. DSIR, Christchurch, New Zealand.

WEINERT O. S. (2005). *La guerra de las plantas. Alelopatía*. Universidad de la Concepción, Chile, 36-30.

YOUNG A. (1804). *The Farmers Calendar*. London

ZAMORANO M. C. (2006). Alelopatía: un nuevo reto en la ciencia de las arvenses en el trópico. *Agronomía* 14 (1), 7-15.

ZHENG-KUI L., YING-FANG H., GUO-PING G. YU-HONG (1990). Chemical constituents of the essential oils from the leaves of *Laurus nobilis* and tendency in changes of the constituents month by month. *Acta Botanica Sinica* 32, 878-882.

## **8. Agradecimientos.**

Quiero agradecer a todos aquellos que han colaborado y que me han ayudado durante la realización de mi tesis de máster:

- A D. Herminio Boira del Instituto Agroforestal Mediterráneo, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en dicho Instituto y su ayuda en todo momento.
- A Dña. Amparo Blázquez de la Facultad de Farmacia, por la ayuda prestada en la realización de mi tesis y lectura crítica de esta.
- A Dña. Mercedes Verdeguer del Instituto Agroforestal del Mediterráneo, por la lectura crítica de la tesis, y sobre todo, por haberme dirigido y soportado, representando una figura fundamental, desde el punto de vista profesional y humano.
- A David García y Marcello Militello del Instituto Agroforestal Mediterráneo y del CRA por haber sido unas personas fundamentales para la realización de la tesis, haberme enseñado, ayudado y aconsejado durante mi tesina, ya sea desde el punto de vista científico como humano.
- A todos los miembros del Instituto Agroforestal Mediterráneo, por haberme hecho sentir parte de ellos y haberme ayudado en todo lo posible durante la realización de mi tesis.
- A todos los que han estado a mi lado durante este tiempo, mis queridos amigos: Cristina, Martina, Antonella, Marta, Loredana, Sylwia, Monica, Julia, Lis, Ilaria, Laura, Gema, Isa, Rafa, Manolito, Rubén, Chan, Iván, Wallo, Huete, Sebas, Aloís, mis compañeros de máster ... por convertirse en mi familia Valenciana y simplemente por estar siempre conmigo.
- A todos los que no están aquí en Valencia: mi madre, mi padre, mi hermana, mi familia y mis amigos, que aún sabiendo lo difícil que ha sido venir a Valencia, me han siempre ayudado y apoyado.